



**Evaluación del efecto de la inoculación
de *Bacillus* spp. con potencial fijador de
nitrógeno en cultivos de
Chlorella sorokiniana.**

Daniel Pérez Muñoz

Universidad EAFIT
Escuela de Ingeniería
Departamento de Ingeniería de Procesos
Medellín, Colombia
2015

Evaluación del efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. con potencial fijador de nitrógeno en cultivos de *Chlorella sorokiniana*

Daniel Pérez Muñoz

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero de Procesos

Asesora

I.P., Msc y Cand. PhD. Luisa Fernanda Posada Uribe

Universidad EAFIT

Escuela de Ingeniería

Departamento de Ingeniería de Procesos

Medellín, Colombia

2015

Agradecimientos

Agradezco a los grupos de investigación CIBIOP de la universidad EAFIT por la financiación y asesoría del proyecto. Al grupo BIOMA de la Universidad de Antioquia por su ayuda con los controles positivos, especialmente a Ana María Suárez y Camilo Ramírez. Agradezco también al proyecto de investigación en microalgas Argos-EAFIT por los recursos disponibles para la elaboración de este proyecto de grado.

A mi asesora, Cand. PhD Luisa Posada, que desde el momento que empezamos con este trabajo de grado, estuvo para apoyarme y ofrecerme toda la ayuda posible para tener un muy buen trabajo de grado.

A los profesores Valeska Villegas y Daniel Carvajal que con su conocimiento y experiencias aportaron a la elaboración de este proyecto. Al personal de los laboratorios de la Universidad EAFIT, Sigifredo Cárdenas, Jhon Jairo Estrada y Edgar Arbeláez, por su apoyo. A mi familia por apoyarme durante toda mi vida universitaria.

Al Fondo EPM por darme la oportunidad de poder estudiar la carrera y en la universidad que siempre quise.

Resumen

El uso de microalgas y PGPBs como principio activo de problemas ambientales ha generado interés científico en los últimos años. Entre las soluciones propuestas se encuentra el uso de los cocultivos de estos 2 tipos de microorganismos para la formulación de bioinsumos y la biorremediación. El objetivo de este estudio se centro en evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. con potencial fijador de nitrógeno ambiental en cultivos de *Chlorella sorokiniana* a nivel de matraz. Se encontró que 10 cepas PGPB, del banco de cepas del grupo CIBIOP de la Universidad EAFIT, probablemente fijaron nitrógeno debido a que crecen en medio NFb. De las cuales, *Bacillus subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, aumentando en un 94% la densidad celular y en 4.5 veces el tamaño de la microalga comparada su crecimiento individual. Finalmente se usó el método ARA para evaluar fijación de nitrógeno, y se encontró que la bacteria fue capaz de reducir el acetileno en etileno cuando se siembra en medio NFb y BBM libre de nitrógeno, además cuando se cocultivo con la microalga, lo que indicaría que posiblemente la fijación de nitrógeno sea el método de promoción de crecimiento microalgar.

Palabras Claves: *Bacillus*, *Chlorella*, Fijación de nitrógeno, reducción de acetileno, PGPB, promoción de crecimiento, microalgas, bacterias.

Abstract

The use of microalgae and PGPBs as active ingredient of environmental solutions has generated scientific interest in recent years. Among the proposed solutions is the use of co-cultures of microalgae-bacteria for bioformulation and bioremediation. The aim of this study focuses on evaluate the effect of inoculation of *Bacillus* spp. with potencial of atmospheric nitrogen fixation on *Chlorella sorokiniana* culture flask level. It was found that 10 PGPB of CIBIOP group's bank of strains of Universidad EAFIT, probably fix nitrogen because they growth in NFB medium. *Bacillus subtilis* EA-CB0575 promotes the growth of the microalgae *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, increasing in 94% cell density and 4.5 time the size of the microalgae compared their individual growth. Finally, ARA method was use to evaluate nitrogen fixation, it was found that bacterium was able to reduce acetylene to ethylene when

growth in NFb and nitrogen free BBM medium, also when growth in co-culture with the microalgae, indicating that nitrogen fixation is the method of microalgar growth promotion.

Keywords: *Bacillus*, *Chlorella*, Nitrogen fixation, acetylene reduction, PGPB, growth promotion, microalgae, bacteria

Contenido

Resumen	7
Contenido	9
Lista de figuras	11
Lista de tablas.....	12
Listo de anexos.....	13
Introducción	15
Objetivos.....	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Capítulo 1: Microalgas y PGPB como soluciones ambientales	21
1.1 Microalgas	21
1.1.1. <i>Chlorella</i> spp.....	22
1.2 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPB).....	23
1.2.1 <i>Bacillus</i> spp.....	24
1.3 Uno de los mecanismos directos de promoción de crecimiento asociados a crecimiento de microalgas: Fijación de nitrógeno atmosférico.....	25
1.4 Cocultivos PGPB-Microalga.....	28
Capítulo 2: Evaluación de la capacidad de fijación de Nitrógeno de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en cocultivo con <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230.....	31
2.1 Resumen	31
2.2 Introducción.....	31
2.3 Materiales y métodos.....	33
2.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.....	33
2.3.2 Medios de cultivo y reactivos.....	34
2.3.3 Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno de <i>Bacillus</i> spp. <i>in vitro</i>	34
2.4 Resultados.....	35
2.4.1 Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno de <i>Bacillus</i> spp. <i>in vitro</i>	35
2.5 Discusión.....	37
2.6 Conclusiones	39
Capítulo 3: Evaluación de la interacción microalga-bacteria en Cocultivos <i>Chlorella</i> <i>sorokiniana</i> – <i>Bacillus subtilis</i>	41
3.1 Resumen	41
3.2 Introducción.....	42
3.3 Materiales y métodos.....	45

3.3.1	Microorganismos y condiciones de cultivo.....	45
3.3.2	Medios de cultivo y reactivos.....	45
3.3.3	Cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> en vida libre y determinación de cinética de crecimiento	46
3.3.4	Cultivo de <i>Bacillus</i> spp. y cinética de crecimiento bacteriano en vida libre	46
3.3.5	Medición de la densidad celular bacteriana por el método de tinción con CSFE (diacetato de carboxifluoresceína)	47
3.3.6	Co-cultivo DE <i>Chlorella sorokiniana</i> Y <i>Bacillus</i> spp. EN VIDA LIBRE	47
3.3.7	Modelamiento matemático del crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en crecimiento individual y en cocultivo con <i>B. subtilis</i>	48
3.3.8	Análisis estadístico de los datos.....	48
3.4	Resultados.....	49
3.4.1	Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 en cocultivo con <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575.....	49
3.4.2	Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 en cocultivo con <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230.....	51
3.3.1	Efecto en el tamaño de la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 en cocultivo con <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575	52
3.3.2	Modelamiento matemático de <i>Chlorella sorokiniana</i> en crecimiento individual y en cocultivo con <i>B. subtilis</i>	54
3.5	Discusión.....	55
3.6	Conclusiones.....	57
Capítulo 4: Determinación de fijación de nitrógeno por el método de reducción acetileno-etileno.....		
		58
4.1	Resumen	58
4.2	Introducción	58
4.3	Materiales y métodos.....	61
4.3.1	Microorganismos y reactivos	61
4.3.2	Evaluación de fijación de nitrógeno por método ARA	61
4.3.3	Curvas de calibración etileno y acetileno.....	62
4.3.4	Fijación de nitrógeno por método ARA en medio NFb.....	63
4.3.5	Evaluación de la fijación de nitrógeno en cocultivos de <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 - <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 por método ARA	63
4.3.6	Análisis estadístico de los datos.....	64
4.4	Resultados.....	65
4.4.1	Ensayos preliminares para estandarización del método.....	65
4.4.2	Curvas de calibración acetileno y etileno.....	65
4.4.3	Fijación de nitrógeno en medio NFb por método ARA.....	66
4.4.4	Evaluación de la Fijación de nitrógeno en cocultivos de <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 con <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 por método ARA.....	68
4.5	Discusión.....	70
4.6	Conclusiones	71
Conclusiones y recomendaciones.....		73
Anexos		75
Bibliografía.....		77

Lista de figuras

Figura 1-1. Ciclo del nitrógeno (Dréo, 2009)	25
Figura 1-2. Cromatografía de gases para una mezcla equivolumétrica de acetileno-etileno	27
Figura 2-1 Cambio de color después de 7 días de incubación en medio NFb. En la fotos de la izquierda muestra la cepa <i>B. subtilis</i> EA-CB0015, <i>B. subtilis</i> EA-CB0575y medio sin cultivo (Blanco), en la foto de la derecha control negativo (<i>E. coli</i>), <i>B. pumilus</i> EA-CB0177 y blanco sin cultivo (Blanco). Se usó filtro de inversión de color para identificar mejor el cambio de color.	37
Figura 3-1 Interacciones entre microalgas y bacterias en la ficosfera. (+) Relación positiva; (-) relación negativa (Munoz and Guieysse, 2006).	43
Figura 3-2 Seguimiento fotográfico del crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 en cocultivo con <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575. De izquierda a derecha en cada fotografía: Cultivo de la Microalga, cocultivo Microalga-bacteria y cultivo de la bacteria.	49
Figura 3-3 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 en cocultivo con <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575.....	50
Figura 3-4 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 en cocultivo con <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575.....	51
Figura 3-5 Microscopia de fluorescencia de <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 (100x) luego de 5 días de cultivo en BBM modificado sin nitrógeno	52
Figura 3-6 Microscopia de <i>Chlorella sorokiniana</i> (100x) luego de 8 días de cultivo en BBM modificado sin nitrógeno	53
Figura 3-7. Microscopia de <i>Chlorella sorokiniana</i> en cocultivo con <i>Bacillus subtilis</i> (100x) luego de 8 días de cultivo en BBM modificado sin nitrógeno.....	53
Figura 3-8 Linealización del modelo exponencial durante la etapa exponencial del crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> con y sin cocultivo con <i>B. subtilis</i>	54
Figura 4-1 Modelación 3D de la enzima nitrogenasa (Anderson, 2013)	59
Figura 4-2. Cronogramas para los gases puros y la mezcla de estos	65
Figura 4-3 Curva de calibración para acetileno usando las condiciones mencionadas en el numeral 4.3.2.....	66
Figura 4-4. Curva de calibración para etileno usando las condiciones mencionadas en el numeral 4.3.2.....	66

Figura 4-5. Cromatogramas a diferentes tiempos del tratamiento para cultivo de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd en medio NFb. A: Tiempo0 h, B: Tiempo 0.5 h, C: Tiempo 1h. TR: Tiempo de retención.	68
Figura 4-6. Cromatogramas a diferentes tiempos del tratamiento para cocultivo <i>C. sorokiniana</i> UTEX1230 + <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en medio BBM sin nitrógeno. Línea roja: Tiempo0 h, Línea negra: Tiempo 0.5 h, Línea azul: Tiempo 1h.	68

Lista de tablas

Tabla 2-1. Cepas PGPB que se emplearon para evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico mediante su cultivo en medio NFb.	34
Tabla 2-2. Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. PGPBs y controles después de 7 días de crecimiento en medio NFb para determinar fijación de nitrógeno.....	36
Tabla 3-1. Tamaño de la microalga <i>C. sorokiniana</i> en μm^2 , en el cocultivo con la bacteria <i>B. subtilis</i> e individualmente en medio BBM sin nitrógeno	52
Tabla 3-2. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para <i>C. sorokiniana</i> en cocultivo con <i>B. subtilis</i>	55
Tabla 4-1 Tratamientos que empleados para la evaluación de la fijación de nitrógeno por método ARA.	64
Tabla 4-2 Resultados del método ARA para la evaluación de la fijación de nitrógeno para las cepas A320, <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 y <i>Azospirillum brasilense</i> Cd en medio NFb.	67
Tabla 4-3 . Resultados del método ARA para la evaluación de la fijación de nitrógeno en el cocultivo <i>C. sorokiniana</i> UTEX1230- <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 y sus respectivos controles.	69

Listo de anexos

Anexo 1. Curva calibración para densidad celular (UFC/mL) vs densidad óptica (absorbancia) para <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 realizada por el método de unidades formadoras de colonia.	75
Anexo 2. Curva calibración para densidad para densidad celular (UFC/mL) vs densidad óptica (absorbancia) para <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 realizada por el método tinción con CSFE.....	75
Anexo 3. Microscopias de fluorescencia de <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575 y <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 (100x) en BBM modificado sin nitrógeno.	76

Introducción

En los últimos cincuenta años se ha incrementado el consumo energético y alimenticio debido al aumento poblacional (PRB, 2014; Jones and Mayfieldt, 2012; Bhardwaj et al., 2014). Esto ha originado problemas ambientales y de salud, causados por el uso de técnicas no sostenibles para suplir con las necesidades. Entre las principales causas de la problemática ambiental y de salud actual están: Alto consumo de combustibles fósiles (Horrigan et al., 2002), que posterior a su uso generan altas cantidades de gases de efecto invernadero como metano, N_2O y dióxido de carbono (Jones and Mayfieldt, 2012); además de la agricultura convencional que se caracteriza por los monocultivos, el alto consumo de agua, la aplicación de grandes cantidades de pesticidas y fertilizantes químicos (Horrigan et al., 2002; Santos et al., 2012).

La agricultura tiene un gran impacto debido al consumo de agroquímicos. Se estima que en el 2014 entre fertilizantes y pesticidas se consumieron 200 megatoneladas en el mundo (FAO, 2014; IFA, 2014), de las cuales, la mayoría son desaprovechados por la planta (Kegley et al., 1999; Adesemoye and Kloepper, 2009) y se dirigen a las fuentes de agua, aire y suelo, produciendo eutrofización, gases de efecto invernadero y generando enfermedades en animales y humanos (Horrigan et al., 2002; Pimentel, 2005; Parrón et al., 2014). Adicionalmente, la producción de estos agroquímicos requiere de grandes cantidades de energía debido a que se emplea el método Haber-Bosch, el cual libera cerca de 300 millones de toneladas de CO_2 al año (Cherkasov et al., 2015)

Una alternativa para dar solución o mitigar los problemas ambientales existentes en la actualidad es el uso de la biotecnología, la cual, por medio del uso de los potenciales que los microorganismos ofrecen al ser humano, desarrolla procesos de impacto positivo en el

bienestar de la población (Chen et al., 2005), donde las microalgas y el uso de PGPB's tienen un papel importante.

Las microalgas son microorganismos que han generado interés de la comunidad científica y se han empleado en procesos biotecnológicos debido a su rápido crecimiento y la capacidad de generar compuestos para la industria (Spolaore et al., 2006; Zheng et al., 2013). Adicionalmente, son ampliamente utilizadas en mitigación de impactos ambientales por su potencial de biorremediación en la captura de gases efecto invernadero como el CO₂ (son capaces de capturar hasta 10 veces más CO₂ que las plantas terrestres) (Pires et al., 2011; Pires et al., 2012; Lakaniemi et al., 2013) y se han empleado en el tratamiento de aguas residuales (Valderrama et al., 2002).

El uso de bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB, por sus siglas en inglés "Plant Growth Promoting Bacteria") es una de las estrategias para disminuir los efectos negativos de la agricultura tradicional (Horrigan et al., 2002). Estos microorganismos actúan en la planta mejorando su crecimiento y desarrollo y se ha determinado que permiten sustituir parte de los fertilizantes y pesticidas tradicionales, debido a que pueden promover el crecimiento, favorecer la disponibilidad y el consumo de nutrientes, además de prevenir enfermedades en las plantas (Adesemoye and Kloepper, 2009). Sin embargo, el estudio de estos microorganismos requiere largos periodos de evaluación, primero a nivel *in vitro* y luego en planta, debido a la complejidad en las relaciones planta-ambiente-microorganismo que son principio de su actividad (Dardanelli et al., 2011); y dependiendo de la especie vegetal a evaluar, el tiempo de estudio para determinar el éxito de la aplicación del microorganismo varía de semanas a meses, incluso años, en el caso de plantas perennes (Esitken et al., 2010; Luna et al., 2012). Sin embargo se ha estudiado el potencial de promoción de crecimiento de bacterias en modelos más simples como las microalgas, lo que favorecería a disminuir el tiempo y el costo proveniente de la investigación directa en plantas (Bashan et al. 2011)

En este trabajo se evaluó el potencial de fijación de nitrógeno de 22 cepas PGPB aisladas de la rizosfera de plantas de banano del Urabá antioqueño y conservadas en la Universidad EAFIT para ser principio activo de bioinsumos para la agricultura. Se empleó el método de siembra en medio libre de nitrógeno, posteriormente, entre las bacterias que presentaron resultados positivos de crecimiento se seleccionó una cepa, el *B. subtilis* EA-CB0575, con potencial fijador de nitrógeno con el fin de evaluar su interacción con la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230. Para ello se cultivaron las cepas de microalga y bacteria

individualmente y su crecimiento y desarrollo se comparó con el cocultivo en medio BBM libre de nitrógeno. Se evaluó la densidad celular de los diferentes tratamientos y se determinó que la presencia de las PGPB mejora la concentración celular y el tamaño de la microalga con porcentajes de aumento de 94% y el 400%, respectivamente. Con el fin de determinar si el método de promoción de crecimiento que emplea la bacteria es fijación de nitrógeno, se evaluó la actividad nitrogenasa en cultivos con el microorganismo individualmente y en cocultivo con la microalga; y se determinó que efectivamente el microorganismo reduce el acetileno presente en la atmósfera de los cultivos a etileno, razón por la cual se sugiere que existe actividad nitrogenasa en el metabolismo del *Bacillus* y que puede ser fijador de nitrógeno.

Con este trabajo se espera ampliar el espectro de acción y conocimiento de las PGPB's del grupo de investigación CIBIOP de la Universidad EAFIT, conocer la capacidad de fijación de nitrógeno del cepario y desarrollar posibles estrategias de evaluación de PGPB's a nivel *in vitro* y con mayor rapidez, debido al rápido crecimiento y desarrollo de las microalgas, empleadas como "modelo de células vegetales" para un rápido tamizaje. A su vez, los resultados de este trabajo pueden extrapolarse a desarrollo de biofertilizantes para la agricultura que permitan reducción en los efectos de agroquímicos a nivel ambiental y social.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. con potencial fijador de nitrógeno ambiental en cultivos de *Chlorella sorokiniana* a nivel de matraz.

Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de *Bacillus* spp. mediante su producción en un medio de cultivo deficiente en nitrógeno
- Evaluar la capacidad de promoción de crecimiento microalgar de *Bacillus* spp. en cocultivo con la microalga *Chlorella sorokiniana*
- Evaluar la fijación de nitrógeno atmosférico en cocultivos *Bacillus* spp.-*Chlorella sorokiniana* por el método reducción de Acetileno-etileno.

Capítulo 1: Microalgas y PGPB como soluciones ambientales

Entre las propuestas para mitigar los problemas ambientales y de salud generados por el alto consumo energético y alimenticio, se encuentra el uso de la biotecnología. La cual, usa el potencial de organismos vivos para el diseño y mejoramiento de procesos de una manera más sostenible (Chen et al., 2005; Ezeonu et al., 2012). Entre los productos biotecnológicos desarrollados se encuentran biodetergentes, biodisolventes, procesos de biorremediación, productos microbianos para tratamiento de residuos, bioinsumos, entre otros (Ezeonu et al., 2012). Todos ellos desarrollados a partir de metabolitos producidos por microorganismos como las microalgas, bacterias, hongos y organismos superiores.

Las microalgas y las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés), son principio activo de diversos productos biotecnológicos. Actualmente, estos microorganismos son foco de interés en la industria por potenciales alternativas para la producción de compuestos de diversas aplicaciones agrícolas y ambientales (Horrigan et al., 2002; Valderrama et al., 2002; Spolaore et al., 2006). A continuación se describen estos microorganismos y algunas de las aplicaciones potenciales de estos:

1.1 Microalgas

Se consideran microalgas a todos los microorganismos fotosintéticos que no sean plantas (Zhu et al., 2013). Las microalgas pertenecen al reino protista, debido a que son organismos unicelulares o pluricelulares que no forman tejido (Zhu et al., 2013). Pueden ser organismos procariotas (cianobacterias) ó eucariotas (la mayoría de microalgas), tienen un tamaño de entre 1 μm y 2 mm (Camacho et al., 2004b; Zhu et al., 2013) y se pueden encontrar en fuentes de agua salada y dulce, donde representan un alto porcentaje del fitoplancton (Pasquet et al., 2011). Se considera el grupo de microorganismos marinos más variado ya que existen aproximadamente 20 mil millones de especies diferentes (Camacho et al., 2004b; Pasquet et al., 2011). Entre las especies más importantes se encuentran las

diatomeas, dinoflagelados y clorofitas, debido a que son las principales productoras de alimentos del ecosistema marino (Camacho et al., 2004b).

Las microalgas son capaces de aprovechar la energía solar junto con agua y minerales para la producción de biomasa, y posteriormente de esta biomasa pueden extraerse diversos componentes de interés industrial y comercial (Rahaman et al., 2011; Forján et al., 2015). Estos organismos son encargados de realizar cerca del 50% del total de la fotosíntesis en nuestro planeta y al compararlas con las plantas, tienen mayor eficiencia fotosintética, debido a que necesitan menos área para su cultivo, tienen mayor tasa de crecimiento y capturan 10 veces más CO₂ (Lakaniemi et al., 2013).

Estos microorganismos se han empleado principalmente como alimento humano y animal por ser una fuente rica en proteínas, que constituyen entre el 50 y el 60% de su composición (Liang et al., 2004; Spolaore et al., 2006). A partir de los años 60's las microalgas se comenzaron a usar como fábricas de metabolitos, para aplicaciones médicas. Entre los metabolitos que se pueden obtener de ellas se encuentran los ácidos grasos, los carotenoides, bioplásticos, aditivos para alimento para animales y peces y finalmente de lípidos, los cuales se vienen empleando en la producción de biodiesel (Walker et al., 2005; Guedes et al., 2011; Tate et al., 2013). Las microalgas también ayudan en la solución de problemas ambientales como la captura de CO₂, la recuperación de suelos erosionados, tratamiento de aguas residuales y producción de combustibles (Valderrama et al., 2002; Lakaniemi et al., 2013).

1.1.1. *Chlorella* spp.

Chlorella spp. es una microalga simple perteneciente a la familia de Oocystaceae, es unicelular, sin movilidad, de forma esférica y un diámetro entre 2 y 10 micras (Kanno, 2005). Se encuentra en lagos y pantanos de todo el mundo (Wu et al., 2001). Algunas especies de este género, entre las que se encuentra *Chlorella vulgaris*, crecen heterotróficamente usando moléculas orgánicas pequeñas en vez de CO₂ (Choix et al., 2012a). Este género tiene la capacidad de producir una gran variedad de compuestos útiles y de valor comercial, como polisacáridos, lípidos, proteínas, entre otros, a partir de CO₂ (Ji et al., 2011). También son capaces de acumular carbohidratos provenientes de la fotosíntesis y su capacidad de fotosíntesis es mucho mayor que el las plantas (Choix et al., 2012).

La especie *Chlorella sorokiniana* puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Kanno, 2005). En la actualidad hay un gran interés con esta especie para la producción de biodiesel, debido a su alta concentración de lípidos (Prajapati et al., 2014). Puede ser cultivada de forma heterotrófica, autotrófica y mixotrófica (Li et al., 2015). Además resistente a altas temperaturas e intensidades lumínicas, por lo cual se ha usado en estudios de fotosíntesis y producción de biomasa en condiciones extremas (Morita et al., 2001).

1.2 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPB)

La agricultura tradicional es reconocida por la afectación que genera al medio ambiente y a la salud (Horrigan et al., 2002). El uso de agroquímicos es uno de los principales factores nocivos y contaminantes en las actividades antropogénicas actuales y aunque su uso mejora la fertilidad y la productividad de los cultivos, también producen desequilibrio en los sistemas biogeoquímicos asociados su acumulación en el ambiente (Bhardwaj et al., 2014).

Entre las estrategias para mitigar los impacto de la agricultura tradicional, se encuentra el uso de bioinsumos, los cuales benefician el desarrollo de los cultivos y reducen el impacto de productos químicos (Adesemoye and Kloepper, 2009). Muchos de estos bioinsumos emplean como principio activo PGPB's presentes en la biosfera vegetal, las cuales tienen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas (Hynes et al., 2008). Diferentes especies de los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, entre otros, son reconocidas como PGPB's y se emplean en bioproductos de uso común en la agricultura (Lucy et al., 2004). Estos microorganismos pueden emplear diferentes tipos de mecanismos de promoción: aquellos relacionados con el crecimiento y la toma de nutrientes por la planta (Directos) y aquellos que están involucrados en la prevención y control de enfermedades (Indirectos) (Goswami et al., 2013). Entre los mecanismos directos de promoción de crecimiento se encuentran la fijación de nitrógeno, la producción de compuestos reguladores del crecimiento, solubilización de fósforo y hierro, entre otros (Goswami et al., 2013). Entre los mecanismos indirectos se encuentra la producción de antibióticos, sideróforos y la inducción de resistencia sistémica (Goswami et al., 2013).

Diferentes investigaciones han reportado el efecto positivo que tienen las PGPB's en varias especies vegetales y en microalgas (Bashan et al., 2002; de-Bashan and Bashan, 2008; Hernandez et al., 2009). Algunos de los hallazgos en el tema, se han evidenciado que la aplicación de *Herbaspirillum* sp. en cultivos de arroz, aumenta el rendimiento de la planta en 7.5 g/planta a nivel de invernadero (Hayat et al., 2010), así mismo, al aplicar *Azospirillum* sp. en cultivos de algodón aumenta la cantidad de algodón en 0.91 mg por planta (Fayez and Daw, 1987) y otros reportes como el de Hernández et al. (2009) presentan la evaluación de la promoción de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cocultivo inmovilizado en la presencia de *Bacillus pumilus*, determinando que en medio sin nitrógeno se aumenta la densidad celular de la microalga en cerca de un 40%.

1.2.1 *Bacillus* spp.

Los microorganismos pertenecientes a este género son las bacterias más abundantes en la rizosfera (Saharan and Nehra, 2011), son microorganismos Gram positivos los cuales son formadores de endosporas, característica que les brinda resistencia al calor, la luz UV y a diferentes pH's. (Talebi et al., 2013). Son aerobios o anaerobios facultativos a diferencia de otros como *Clostridium* que son anaerobios obligados (Maal et al., 2009). Estos microorganismos pueden dispersarse fácilmente en el aire por lo cual se encuentran en diversos ambientes (Merrill et al., 2006), son reconocidos como productores de enzimas y metabolitos de uso diverso a nivel industrial y farmacéutico (Maal et al., 2009) y diversas cepas de este género se registran como PGPB's, empleadas en la fabricación de biofertilizantes y biocontroladores de patógenos (Adesemoyea et al., 2010; Talebi et al., 2013).

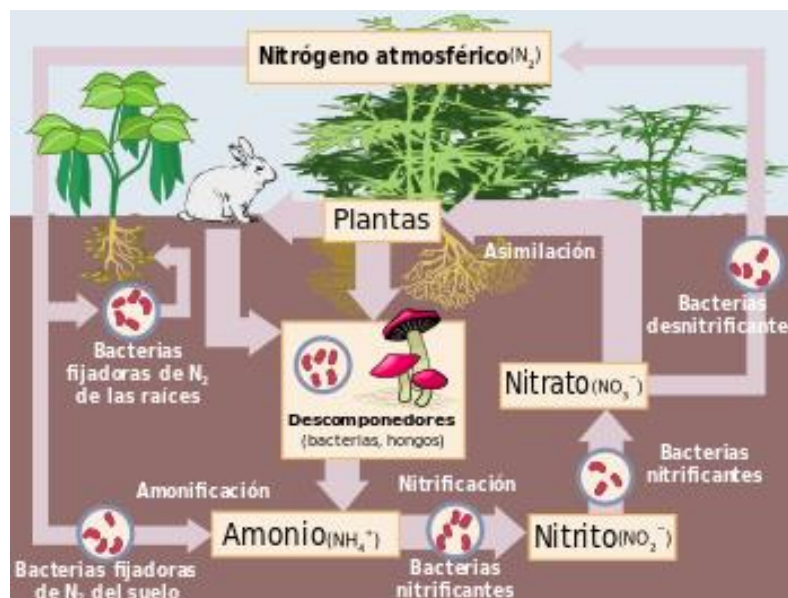
Dentro de sus especies, *Bacillus subtilis* es una de las más estudiadas respecto a su genética y biología, se encuentra principalmente en forma de esporas en los suelos, y en presencia de los nutrientes suficientes puede germinar y proliferar. Estos microorganismos se reconocen por formar diferentes morfologías, debido a que se encuentran variaciones genéticas entre cepa y cepa (Aguilar et al., 2007). Se ha referenciado algunas cepas promotoras de crecimiento (Bai et al., 2003; Rekha et al., 2007), las cuales pueden actuar en la planta por métodos directos e indirectos (Earl et al., 2008) y se han reportado en diversas especies vegetales como banano, mostaza, pepino, tomate, entre otros con resultados exitosos luego de la aplicación de los microorganismos (Raupach and Kloepper,

1998; Zaidi et al., 2006; Mena-Violante and Olalde-Portugal, 2007; Ceballos et al., 2012; Ngamau et al., 2015)

1.3 Uno de los mecanismos directos de promoción de crecimiento asociados a crecimiento de microalgas: Fijación de nitrógeno atmosférico.

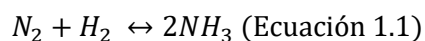
El nitrógeno es un elemento que se encuentra en la naturaleza en sistemas cíclicos en forma de nitratos, nitritos, amonio, amoniaco, nitrógeno diatómico, nitrógeno orgánico. (Zhou et al., 2014). Este elemento se ve regulado naturalmente por el ciclo del nitrógeno, el cual se presenta en la Figura 1-1.

Figura 1-1. Ciclo del nitrógeno (Dréo, 2009)

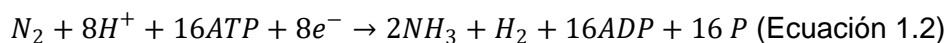


Se estima que el 98% de nitrógeno se encuentra en rocas o en la atmósfera, este no puede ser aprovechado por la mayoría de seres vivos, por lo cual se hace necesario convertirlo en formas asimilables (Galloway, 1998). El nitrógeno de la atmósfera, mediante la fijación de nitrógeno, se convierte en amonio y óxidos de amonio. Los cuales son asimilados por las plantas para ser convertido en moléculas de mayor tamaño. Luego los animales se alimentan de las plantas y obtienen el nitrógeno de ella. Por descomposición se devuelve el nitrógeno de las plantas y animales al suelo, donde es aprovechado de nuevo. Durante todo el ciclo se desnitrifica las moléculas con nitrógeno forma de nitrógeno diatómico.

Uno de los pasos para convertir el nitrógeno no aprovechable, en este caso el atmosférico, en forma asimilable es la fijación de nitrógeno (Galloway, 1998). En este proceso se convierte el N_2 en iones de amonio. Existen 3 tipos de fijación de nitrógeno: la biológica, la geoquímica y la industrial. Se estima que entre los 3 métodos se fijan entre 130-200 toneladas de nitrógeno anualmente (Galloway et al., 2004). En el proceso geoquímico, gracias a la energía liberada por los rayos, las moléculas de N_2 y O_2 en la atmosfera, se oxidan formando óxidos de nitrógeno (Galloway et al., 2004). El proceso industrial usa la reacción de Haber-Bosch, donde N_2 y H_2 mediante una reacción de síntesis forman amoniaco, la ecuación general para la reacción es la siguiente (Ecuación 1.1) (Seefeldt et al., 2013; Cherkasov et al., 2015):



En el proceso biológico, microorganismos fijan el nitrógeno mediante la enzima nitrogenasa, la cual convierte el N_2 en amonio. Este proceso es de gran importancia ya que fija el 65% del total del nitrógeno fijado (Herridge, Peoples, & Boddey, 2008; Ji, Zhang, & Cai, 2011). Es un proceso que consume energía y esta relacionado con los procesos del ciclo de carbono en los microorganismos fijadores, siguiendo la reacción química presentada a continuación (Ecuación 1.2) (Herridge et al., 2008; Ji et al., 2011; Seefeldt et al., 2013).



La determinación del nitrógeno fijado biológicamente y el total de reservas que se tienen en el planeta son importantes para entender y manejar el ciclo del nitrógeno. Con el fin de realizar estas determinaciones se han establecido 5 metodologías básicas para detectar el nitrógeno fijado por esta vía (Herridge et al., 2008). Estas son: El uso de isotopos de ^{15}N , balances de materia, método de ureido, y el método de reducción de acetileno (ARA).

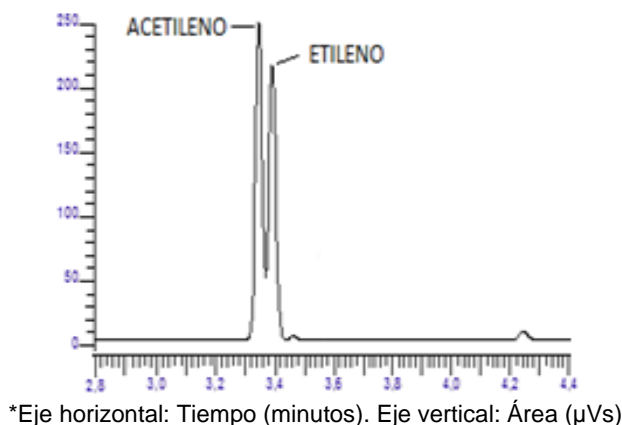
La primera de estas metodologías es el uso de isotopos ^{15}N . Fue el primer método empleado. Su principio se basa en el crecimiento de microorganismos en una atmósfera cargada con los isótopos, luego se mide la cantidad de los isotopos en los organismos y se determina la cantidad fijada. Este método solo se puede evaluar en laboratorio, muy sensible y costoso (Stewart et al., 1967). El segundo método es el de balance de materia. Para este existen dos variaciones. La primera consiste en medir la cantidad de nitrógeno en el tiempo y la segunda en determinar la cantidad de nitrógeno de un microorganismo fijador vs. uno que no fije nitrógeno. Se determina la diferencia en el elemento y se presume

que esta es la cantidad fijada. Estos métodos no tienen en cuenta la cantidad de nitrógeno perdido por desnitrificación y necesitan gran cantidad de información, lo que hace que sea complejo su uso (Herridge et al., 2008).

Otro de los métodos es el método del ureido, este se basa en medir la cantidad de alantoína y ácido alantoideo, estos compuestos son producto de la fijación de nitrógeno liberado por las plantas fijadoras, se puede interpolar la cantidad de estos compuestos con la cantidad de nitrógeno fijado. Este es un método simple y económico pero sólo puede aplicarse en unos pocos fijadores de nitrógeno (Herridge et al., 2008).

Por último, se encuentra el método de reducción acetileno (ARA del inglés Acetylene Reduction Assay). Esta técnica ha ganado popularidad por su simplicidad, alta sensibilidad y rapidez. Se basa en la capacidad de la enzima nitrogenasa para reducir acetileno en etileno. Para esta detección se inocula el organismo en una atmósfera con acetileno y luego de un tiempo se toma una muestra de la atmósfera para medir los gases presentes. Si la enzima se encuentra presente y actuó, se registrará la presencia de etileno en el cromatógrafo de gases (Figura 1-2). Posteriormente se realiza el cálculo de la cantidad de nitrógeno fijada teniendo en cuenta que estudios previos han determinado que es que por cada mol de etileno producido se fijan 0.33 moles de nitrógeno diatómico (Hardy et al., 1968; Hardy et al., 1973; Flett et al., 1976). Este método se ha reportado en diversos trabajos (Fishbeck et al., 1973; Dalton and Whittenbury, 1976; Zuberer and Silver, 1978; Vessey, 1994; Staal et al., 2001).

Figura 1-2. Cromatografía de gases para una mezcla equivolúmica de acetileno-etileno



1.4 Cocultivos PGPB-Microalga

El uso de bacterias promotoras de crecimiento asociadas con microalgas ha generado interés en la comunidad científica debido al potencial que tiene el cocultivo para encontrar soluciones a problemas ambientales, aumentar la producción de biomasa y de metabolitos secundarios, y mejorar el conocimiento en la interacción procariota-eucariotas (Lee et al., 2008; Choix et al., 2012b).

Diferentes autores (de-Bashan et al., 2002; Choix et al., 2012b, a; Cho et al., 2015) han evaluado como el cocultivo de los microorganismos afecta fisiológica y bioquímicamente a ambos de los presentes en el cultivo celular y cómo se podrían potenciar la producción de metabolitos para un uso comercial. Dentro de los reportes encontrados en el tema se encuentra el trabajo de Pérez et al. (2010), quienes han usado el cocultivo entre la microalga *C. vulgaris* y la PGPB *A. brasilense* Cd para la remoción de fosfatos y amonios en aguas residuales, encontrando que hay un aumento significativo en la concentración celular de la microalga en cocultivos respecto al cultivo de la microalga sola. A su vez se determinó que hubo un aumento del 10% en la remoción de fosfatos y de 8% en la remoción de nitrógeno en el cultivo.

Por su parte, Choix et al. (2012a, b) evaluaron la concentración de carbohidratos totales de las microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX2714 y *Chlorella sorokiniana* UTEX2805 cuando se inmovilizaba en matriz de alginato con la PGPB *A. brasilense* Cd en medio SGM: Estos autores determinaron que hubo un aumento de 3-15 veces en la productividad de formación de carbohidratos cuando se cocultivó en comparación a cuando la microalga se sembró sola. A su vez, Cho et al. (2015) evaluaron el porcentaje total de lípidos cuando se sembró *C. vulgaris* OW-01 con un consorcio de PGPB's, determinado que en cocultivo se aumentó la cantidad de lípidos totales en un 6%, respecto al cultivo axénico de la microalga.

Estos sistemas de cultivo se han estudiado desde 2008 para evaluar la interacción planta-PGPB, debido a que es más simple que la evaluación de esta interacción en plantas. La cercanía filogenética de las microalgas con las plantas favorece estudios de interacción plantas-procariotas (Devereux et al., 1990; de-Bashan et al., 2015). En estos estudios se ha encontrado que de la misma manera que las PGPB promueven el crecimiento en plantas se aumenta el crecimiento en microalgas.

Este trabajo se buscó evaluar cuáles microorganismos selectos pertenecientes al grupo de PGPB, previamente aisladas y evaluadas en el grupo de investigación CIBIOP, eran

posiblemente fijadoras de nitrógeno mediante la siembra en medio NFb. De las cepas que dieron positivo al método siembra en NFb, se seleccionó una para evaluar si esta tenía la capacidad de promover el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* a nivel de matraz en vida libre en medio libre de nitrógeno cuando se cultivaron juntas. Posteriormente, si se presentó promoción, verificar si esta se deba al mecanismo de fijación de nitrógeno atmosférico mediante el método ARA.

Capítulo 2: Evaluación de la capacidad de fijación de Nitrógeno de *B. subtilis* EA-CB0575 en cocultivo con *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230

2.1 Resumen

Con el fin de evaluar la promoción de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 por parte de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se seleccionó una PGPB fijadora de nitrógeno proveniente del banco de cepas del grupo CIBIOP de la Universidad EAFIT. 22 PGPB, 5 cepas fueron usadas como controles positivos y una como control negativo fueron sembradas en medio NFb y se evaluó el crecimiento luego de 8 días de incubación. Se encontró que un 10 de las 22 cepas evaluadas, tienen un alto crecimiento en el medio NFb, lo que sugiere que estas cepas son posibles fijadoras de nitrógeno atmosférico. Entre estas cepas se encuentran algunas de las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens*. El 54,6% de las cepas no presenta crecimiento en el medio NFb y se consideran que probablemente no son fijadoras de nitrógeno.

2.2 Introducción

El nitrógeno es un elemento esencial debido a que se emplea en la síntesis de enzimas, proteínas, clorofila, ADN y ARN (Cherkasov et al., 2015). La fijación de nitrógeno es el proceso por el cual se convierte el nitrógeno atmosférico en iones de amonio que pueden ser aprovechados por los organismos vivos. Se han identificado tres tipos de fijación de nitrógeno: La biológica, la geoquímica y la fijación industrial (Galloway et al., 2004).

La fijación geoquímica se presenta debido a que cuando los rayos golpean las atmósfera, convierten las moléculas de nitrógeno diatómico y oxígeno en óxidos de nitrógeno (Galloway et al., 2004). La fijación industrial se presenta cuando se lleva a cabo la reacción

de Haber – Bosch, la principal fuente de compuestos nitrogenados, en la cual el nitrógeno atmosférico y H_2 reaccionan para formar amoníaco. Este proceso es la principal fuente de fertilizantes nitrogenados, es altamente contaminante ya que necesita grandes cantidades de gas natural para producir el H_2 (Galloway et al., 2004; Seefeldt et al., 2013)

La fijación biológica es aquella en que los microorganismos convierten el N_2 atmosférico en moléculas de amonio. Los microorganismos encargados de este proceso se denominan diazótrofos y se limitan a algunas bacterias y cianobacterias de géneros como *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Hayat et al., 2010; Vessey, 2003). Este proceso es catalizado por la enzima nitrogenasa, (Herridge et al., 2008; Ji et al., 2011; Seefeldt et al., 2013).

Las bacterias fijadoras se encuentran normalmente en simbiosis con las plantas, proveyendo el nitrógeno en forma de amonio y alimentándose de los compuestos orgánicos que la planta exuda por su metabolismo (Herridge et al., 2008).

Son diversos los trabajos realizados con bacterias fijadoras de nitrógeno. Se ha evidenciado que al inocular *Bacillus* M3, una bacteria fijadora de nitrógeno, en frambuesa se aumenta en un 33% en el rendimiento de la planta (g/planta) comparado con frambuesa sembrada sin inocular a nivel de campo (Orhan et al., 2006). Al inocular garbanzo con *Bacillus subtilis* OSU-142, se aumentó en un 7% la cantidad de nitrógeno y en un 15% el tamaño de la planta en campo (Elkoca et al., 2007).

Se ha encontrado que algunas especies de *Bacillus* spp. son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, diferentes autores han evaluado esta capacidad para este género. Xie et al. (1998) aisló 16 cepas fijadoras de nitrógeno de arroz usando el método ARA, en las cuales se encontraban *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. azotoformans*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. firm.* En otro trabajo Yokoyama (Yokoyama, 2012) patenó un cepa de *B. pumilus* fijadora de nitrógeno que promueve el crecimiento de las plantas.

Sin embargo, otros autores han reportado que este género de bacterias no fija realmente nitrógeno atmosférico. Seldin et al. (1984) reportó que las cepas *Bacillus polymyxa* L y *Bacillus macerans* NCTC 6355, que habían sido positivas en cultivo en medio NF, realmente no fijan nitrógeno atmosférico debido a que en la confirmación de esta capacidad bioquímica por el método ARA (“Acetylene reduction assay”) los resultados fueron

negativos. Otro autor al evaluar cepas aisladas de arroz mediante la siembra en medio IRRI, el cual se usa para aislar cepas fijadoras de nitrógeno, encontró que cepas de *B. subtilis* JM4 y *B. megaterium* DSM 32 no fijaban nitrógeno, debido a que dieron negativo al método ARA y no se encontraron los genes que codifican para producción de nitrogenasa (familia de genes *nif*) en su genoma (Ding et al., 2005).

El presente capítulo tiene como objetivo determinar el potencial de fijación de nitrógeno de 22 PGPB's del cepario del grupo investigación de CIBIOP, de la Universidad EAFIT, mediante la siembra en medio NFb para posteriormente emplearlas en estudios de promoción de crecimiento con la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Para el presente proyecto se utilizaron 22 cepas promotoras de crecimiento vegetal, previamente evaluadas en proyectos de investigación liderados por el grupo de investigación CIBIOP, de la Universidad EAFIT, Medellín (Tabla 2-1) Estos microorganismos fueron aislados de la rizósfera de las plantas de banano del Urabá Antioqueño (Noreste de Colombia 1352081 N, 1044577 E) e identificadas por secuenciación de 16S rDNA. Estas cepas fueron probadas en plantas de maíz y banano, además algunas de ellas se han evaluado en plantas de pimentón, crisantemo y café. Como control positivo se evaluaron 5 cepas (A320, A328, A329, A332, A369) las cuales previamente han sido evaluadas como fijadoras de nitrógeno. donadas por el grupo BIOMA de la Universidad de Antioquia (Profesor Camilo Ramírez y su estudiante Ana María Suarez) (Suárez-Mesa, 2014) y previamente evaluadas en medio Burk libre de nitrógeno. Se empleó además una cepa de *Escherichia coli* previamente probada como control negativo. Las diferentes cepas se almacenaron en TSB con glicerol 20% a -80°C y se activaron desde el criovial sembrando en medio TSA 50% e incubando por 24 horas a 30°C antes del uso experimental.

Tabla 2-1. Cepas PGPB que se emplearon para evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico mediante su cultivo en medio NFb.

Cepa	Identificación	Cepa	Identificación
EA-CB0009	<i>Bacillus pumilus</i>	EA-CB0336	<i>Bacillus pumilus</i>
EA-CB0012	<i>Bacillus cereus</i>	EA-CB0570	<i>Bacillus</i> sp.
EA-CB0015	<i>Bacillus subtilis</i>	EA-CB0575	<i>Bacillus subtilis</i>
EA-CB0070	<i>Bacillus pumilus</i>	EA-CB0586	<i>Bacillus subtilis</i>
EA-CB0083	<i>Bacillus cereus</i>	EA-CB0784	<i>Bacillus megaterium</i>
EA-CB0131	<i>Bacillus cereus</i>	EA-CB0959	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
EA-CB0158	<i>Bacillus subtilis</i>	EA-CB1077	<i>Bacillus pumilus</i>
EA-CB0177	<i>Bacillus pumilus</i>	EA-CB1121	<i>Bacillus subtilis</i>
EA-CB0185	<i>Bacillus Megaterium</i>	EA-CB1134	<i>Bacillus pumilus</i>
EA-CB0309	<i>Bacillus pumilus</i>	EA-CB1177	<i>Bacillus pumilus</i>
EA-CB0312	<i>Bacillus pumilus</i>	EA-CB1397	<i>Bacillus pumilus</i>

2.3.2 Medios de cultivo y reactivos

En el presente trabajo se empleó el medio NFb semisólido (“Nitrogen Free Basal”) para la identificación de cepas fijadoras de nitrógeno. Este medio tiene la siguiente composición: Ácido Málico, 5 g/L; KOH, 4 g/L; K₂HPO₄, 0.5 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g/L; CaCl₂, 0.02 g/L; NaCl, 0.1 g/L; FeSO₄·7H₂O, 0.5; NaMoO₄·2H₂O, 2 mg/l; MnSO₄·H₂O, 10 mg/l; solución al 0.5% de azul de bromotimol en 0.2 M KOH, 2 ml; agar, 0.0175%. El pH se ajustó a 6.8 (Eckert et al., 2001). Se usó el medio TSB (“Tryptic Soy Broth” - Merck Millipore) para almacenar las bacterias y el medio TSA (“Tryptic Soy Agar” - Merck Millipore) para la activación de estas.

2.3.3 Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno de *Bacillus* spp. *in vitro*

Con el fin de determinar cuáles PGPB's del cepario de grupo investigación CIBIOP son fijadoras de nitrógeno para luego ser usadas en la promoción del crecimiento de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, se cultivaron la cepas de *Bacillus* spp. presentadas en la Tabla 2-

1 y los controles positivos y negativos en TSA como se enuncia en el punto 2.3.1. La biomasa obtenida en el medio TSA a las 18 horas se resuspendió en ADE (agua destilada estéril) y se centrifugó por 15 min a 4500 rpm, con el fin de realizar un lavado de la biomasa. Posteriormente se ajustó la concentración de la biomasa a una densidad óptica de 1.0 (1×10^8 UFC/mL según curva de calibración previamente realizada por el grupo de investigación).

Se sembraron 20 μ L de la suspensión de cada cepa por inmersión en 10 mL del medio NFb semisólido presente en frascos de 26 mL cerrados herméticamente. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 30°C. La presencia de manto microbiano fue tomada como indicador de crecimiento bacteriano y la actividad de fijación de nitrógeno por parte de las cepas debido a que requiere de nitrógeno para crecer y el medio no lo provee. Adicionalmente, se evidenciaron cambios en la coloración del medio de azul a amarillo, debido posiblemente a la formación de ácidos durante el crecimiento de la bacteria.

La variable de respuesta de estas evaluaciones fue el grado de crecimiento del microorganismo evaluado en el medio NFb. Se empleó una escala cualitativa de 0 a 2 donde cero indica que no existe crecimiento del microorganismo en el medio, 1 indica un bajo crecimiento y 2 indica crecimiento alto de la cepa en el medio NFb. Este ensayo se hizo tres veces en tiempos diferentes. Los resultados presentados corresponden al promedio de las tres evaluaciones. Se presenta además el error estadístico entre los tres experimentos realizados, por cepa se realizaron 3 réplicas por experimento.

2.4 Resultados

2.4.1 Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno de *Bacillus spp. in vitro*

Con el fin de determinar cuáles de las cepas PGPB seleccionados pueden ser fijadoras de nitrógeno se realizó una primera prueba empleando como metodología el crecimiento en medio libre de nitrógeno NFb. Se evaluaron 5 controles positivos y 1 control negativo con el fin de comparar resultados de crecimiento entre las cepas. En la Tabla 2-2 se presentan los resultados de crecimiento, el cual fue positivo si se evidenció la presencia de un manto microbiano en el medio y el cambio del color del mismo por la posible formación de ácidos durante el crecimiento del microorganismo (Figura 2-1)

Tabla 2-2. Crecimiento de *Bacillus* sp. PGPBs y controles después de 7 días de crecimiento en medio NFb para determinar fijación de nitrógeno.

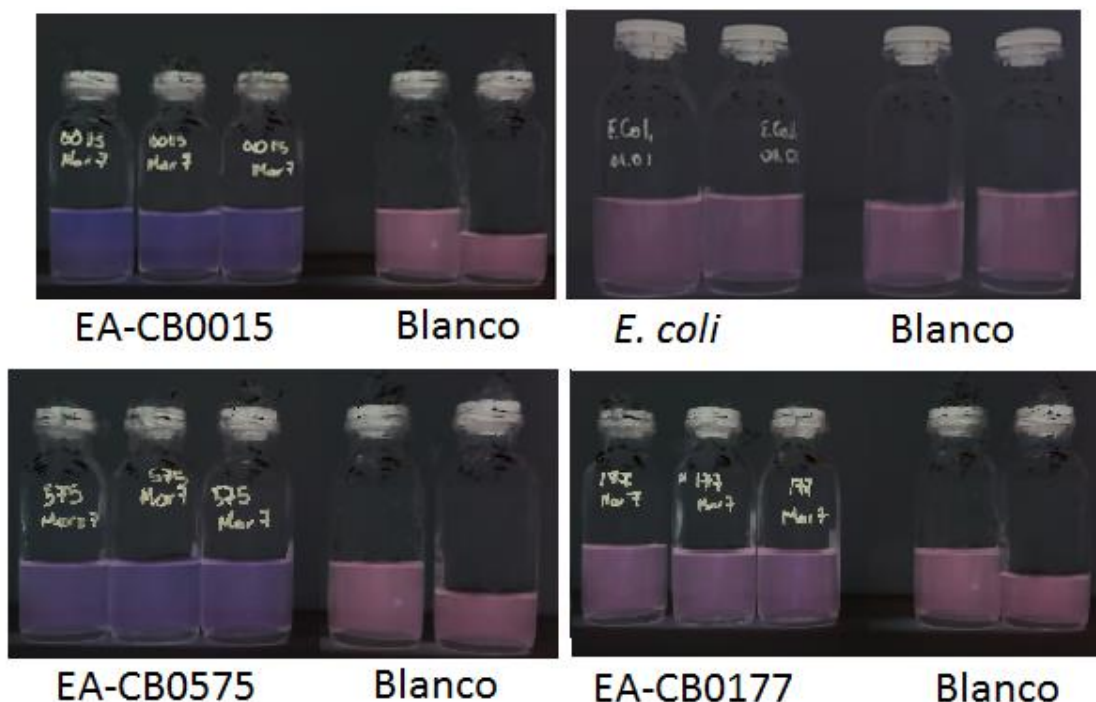
CEPA	IDENTIFICACIÓN	PROMEDIO	ERROR
EA-CB0009	<i>Bacillus pumilus</i>	2	0.00
EA-CB0012	<i>Bacillus cereus</i>	0	0.00
EA-CB0015	<i>Bacillus subtilis</i>	2	0.00
EA-CB0070	<i>Bacillus pumilus</i>	0	0.00
EA-CB0083	<i>Bacillus cereus</i>	0	0.00
EA-CB0131	<i>Bacillus cereus</i>	0	0.00
EA-CB0158	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0.00
EA-CB0177	<i>Bacillus pumilus</i>	1	0.00
EA-CB0185	Sin identificar	1	0.00
EA-CB0309	<i>Bacillus pumilus</i>	0	0.00
EA-CB0312	<i>Bacillus pumilus</i>	2	0.00
EA-CB0336	<i>Bacillus pumilus</i>	0	0.00
EA-CB0570	sin identificar	0.33	0.33
EA-CB0575	<i>Bacillus subtilis</i>	2	0.00
EA-CB0586	<i>Bacillus subtilis</i>	0	0.00
EA-CB0784	<i>Bacillus megaterium</i>	1	0.00
EA-CB0959	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	0.00
EA-CB1077	<i>Bacillus pumilus</i>	0	0.00
EA-CB1121	<i>Bacillus subtilis</i>	2	0.00
EA-CB1134	<i>Bacillus pumilus</i>	1.67	0.33
EA-CB1177	<i>Bacillus pumilus</i>	1	0.00
EA-CB1397	<i>Bacillus pumilus</i>	1	0.00
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	0	0.00
A320	Sin identificar	2	0.00
A328	Sin identificar	0	0.00
A329	Sin identificar	2	0.00
A332	Sin identificar	2	0.00
A369	Sin identificar	1	0.00

*Los valores en la tabla indican: 0 = sin crecimiento en el medio; 1= poco crecimiento en el medio; 2 = alto crecimiento en el medio. Sombreadas en gris se encuentran las cepas que posiblemente son fijadoras de nitrógeno.

Durante esta evaluación se determinó que en la mayoría de las cepas los resultados de crecimiento en el medio fueron consistentes, sólo en las cepas EA-CB570 y EACB-1134 los datos variaron en entre ensayos. Se encontró que 10 de 22 de las cepas, un 45,4%, tienen

un alto crecimiento en el medio NFb, lo cual se puede sugerir que estos microorganismos son probablemente fijadoras de nitrógeno. Mientras el 54,6% de las cepas no presenta crecimiento y se considera que no son fijadoras de nitrógeno. Entre las posibles fijadoras se encuentran cepas de las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens*, que equivalen al 30%, 30% y 10% del total de cepas que crecieron en el medio NFb, respectivamente. Además se destaca que las cepas control A328 y A369, no presentaron crecimiento en el medio NFb.

Figura 2-1 Cambio de color después de 7 días de incubación en medio NFb. En la fotos de la izquierda se muestran las cepas *B. subtilis* EA-CB0015, *B. subtilis* EA-CB0575 y el medio sin cultivo (Blanco), en la foto de la derecha, control negativo (*E. coli*), *B. pumilus* EA-CB0177 y sin cultivo (Blanco). Se usó filtro de inversión de color para identificar mejor el cambio de color.



2.5 Discusión

En esta parte del trabajo experimental se buscaba determinar cuáles de las 22 cepas PGPB, previamente evaluadas eran fijadoras de nitrógeno. Para esto se empleó una metodología de tamizaje, el cultivo en el medio libre de nitrógeno NFb. Por medio de estas evaluaciones se determinó que el 45,4% de las cepas evaluadas son capaces de crecer en medio NFb sin adición de nitrógeno, lo cual sugiere que podrían fijar el nitrógeno ambiental y ser posibles principios activos de productos biológicos para fertilización de las plantas, podrían

ser adecuadas para generar un efecto promotor de crecimiento en microalgas y aportar al estudio de comportamiento eucariota-procariota, empleando la microalga como modelo de planta unicelular. Estas evaluaciones permitieron además seleccionar una cepa potencial para evaluación de cocultivos entre microalga y bacteria como posibles modelos de promoción de crecimiento vegetal a nivel *in vitro*. Entre las cepas que tuvieron alto crecimiento en el medio NFb se encuentran especies como *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens* podrían ser fijadoras de nitrógeno ambiental. Una de las cepas promisorias, el *Bacillus subtilis* EA-CB0575 se seleccionará para trabajar en las próximas evaluaciones del proyecto, debido a que esta ha sido evaluada como PGPBB en banano, maíz, café y flores y además se conoce que es solubilizadora de fosfatos, productora de ácido indolacético y productora de sideróforos (Posada, 2015)

De las 22 cepas evaluadas 12 cepas no presentaron crecimiento ni viraje de color en el medio NFb, lo cual es indicativo de que posiblemente no tienen la capacidad de fijar nitrógeno ambiental.

Previamente en otros estudios se ha usado el medio NFb para la identificación y aislamiento de posibles fijadoras de nitrógeno (Baldani et al., 1986; Andrade et al., 1997; Jha et al., 2009). Ngamau et al (2015) aislaron 43 posibles fijadoras de nitrógeno de plantas de banano en Kenia mediante la siembra en este medio. Los microorganismos aislados se identificaron usando secuenciación por 16S rRNA encontrando cepas de la especie *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas protegens*, *Serratia glossinae*, entre otras. Adicionalmente, se verificó si estos microorganismos eran posibles fijadores de nitrógeno mediante siembra en otro medio de cultivo denominado N-free, llevando los cultivos a incubación durante 4 días a 30°C, y se verificó que todas las cepas que crecieron en NFb fijaban nitrógeno en este otro medio.

Diferentes reportes han indicado que los *Bacillus* no poseen el gen *nif* en su genoma y por tanto no pueden fijar nitrógeno. Autores como Ding et al. (2005) aislaron 7 cepas que tenían en su genoma el gen que codifica para la nitrogenasa (*nifH*). En este estudio además se determinó la capacidad de fijación de nitrógeno empleando el método ARA (Acetylene Reduction Assay), determinando que todas las cepas con el gen podían reducir el acetileno a etileno y alcanzando de productividades entre 2-300 mmol de etileno/mg de proteína. Estas cepas fueron identificadas por medio de la secuenciación del 16S rDNA y se determinó que pertenecían a la especie *Bacillus* y *Paenibacillus*.

2.6 Conclusiones

En esta parte del proyecto se identificaron 10 cepas de 22 evaluadas, con la capacidad de crecimiento en medio NFb (medio libre de nitrógeno) y que podrían ser fijadoras de nitrógeno atmosférico. Las cepas que resultaron positivas para esta prueba pertenecen a las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Los resultados de este objetivo indican que algunos *Bacillus* pueden fijar nitrógeno, pero es necesario evaluar posteriormente por métodos adicionales que confirmen este resultado.

Capítulo 3: Evaluación de la interacción microalga-bacteria en Cocultivos *Chlorella sorokiniana* – *Bacillus subtilis*.

3.1 Resumen

Con el fin de determinar los efectos de la interacción microalga-PGPB se evaluaron cocultivos de la bacteria *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230. Se empleó el medio BBM (“Bristol Basal Modified”) con el fin de evaluar el crecimiento de los microorganismos sin una fuente de nitrógeno disponible. Se evaluaron el cultivo individual de la microalga, el cultivo individual de la bacteria y el cocultivo de ambos microorganismos para determinar si la presencia de la bacteria promotora de crecimiento puede tener un efecto positivo sobre el crecimiento y concentración celular de *C. sorokiniana*. Las variables de respuesta fueron la concentración celular de ambos microorganismo y tamaño celular de la microalga, estos fueron medidos durante 8 días de crecimiento a nivel de matraz. Adicionalmente se determinó la velocidad específica de crecimiento experimental de la microalga en los tratamientos previamente enunciados, para determinar los parámetros cinéticos de los cultivos. Se encontró que la microalga alcanzó una densidad celular de $1,92 \times 10^7$ células/mL en cocultivo luego de 8 días de crecimiento, respecto a una densidad de $9,89 \times 10^6$ células/mL cuando se sembró individualmente, lo que equivale un aumento del 94% en la densidad celular y su tamaño aumentó 4.5 veces en cocultivo en comparación a su crecimiento individual. Respecto al crecimiento de la bacteria se encontró que su densidad celular no presentó diferencias significativas en cultivo individual o en cocultivo con la microalga. Los parámetros cinéticos revelaron un aumento del 73% en la velocidad específica de crecimiento de la microalga en el cocultivo respecto a su crecimiento en cultivo individual. Esto sugiere que la presencia de la bacteria en el cultivo de la microalga mejora la densidad celular, su tamaño y los parámetros cinéticos posiblemente por alguno de los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, y el

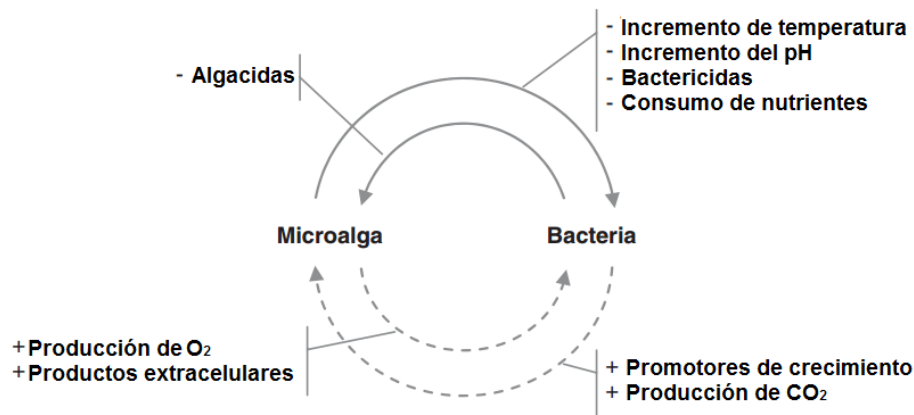
hecho de que estos resultados se logren en medio sin presencia de nitrógeno podrían indicar que la fijación de nitrógeno es ese mecanismo de promoción.

3.2 Introducción

Un cocultivo es la siembra de un conjunto de células de diferentes organismos para permitir interacción entre ellos. Esto tiene como objetivo mejorar la eficiencia de los bioprocesos con respecto al cultivo de un microorganismo individual, potencializando los efectos por medio de la sinergia de los co-cultivados (Bader et al., 2010). Son diversos los cocultivos que se emplean en procesos biotecnológicos (Bader et al., 2010), entre ellos se han referenciado la producción de etanol (Abate et al., 1996), ácido acético (Kondo and Kondo, 1996), antibióticos (Slattery et al., 2001), procesos de bioremediación (Subashchandrabose et al., 2011), entre otros.

En la literatura es posible encontrar referencias de cocultivos de microalgas y bacterias (Tate et al., 2013) con el fin de realizar intercambio de nutrientes o gases entre ambos tipos de microorganismos, potencializar la producción de metabolitos o simplemente estudiar las relaciones entre ambos. La zona donde se presentan estas interacciones se denomina ficosfera y las diferentes consecuencias de estas relaciones se presentan en la Figura 3-1 (Cole, 1982; Guo and Tong, 2014)

Figura 3-1 Interacciones entre microalgas y bacterias en la ficosfera. (+) Relación positiva; (-) relación negativa (Munoz and Guieysse, 2006).



Es posible que la interacción de la bacteria con la microalga sea positiva o negativa para el crecimiento de las dos. Entre las interacciones positivas se encuentra: Producción de compuestos necesario para el crecimiento de alguna de las dos, ejemplo la vitamina B₁₂ y producción de compuestos orgánicos; El intercambio de CO₂/O₂, donde las bacterias durante su crecimiento producen CO₂ necesario para el crecimiento de la microalga, mientras ella produce el O₂ necesario para la respiración y la degradación de materia orgánica por parte de la bacteria (Borde et al., 2003).

Sin embargo, existen también reportes de relaciones negativas entre microalgas y bacterias. Danger et al. (2007), Qu et al. (2014) y Nakashima et al (2006) han reportado este tipo de interacciones presentándose competencia por nutrientes, limitación en el desarrollo celular o producción de compuestos inhibitorios, que pueden afectar el desarrollo de alguno de los dos organismos.

Se sabe que en cultivos naturales, *Chlorella sorokiniana* se encuentra normalmente en compañía de bacterias (Litchfield et al., 1969; Watanabe et al., 2005). Sin embargo, hay pocas publicaciones que estudian la interacción entre estos microorganismos (Tate et al., 2013). Se ha reportado que en cultivo de esta especie de microalga se logró el aislamiento de 29 especies de bacterias asociadas, entre las que se encontraron algunas pertenecientes a los géneros *Pseudomona*, *Acineatobacter*, *Flavobacterium* y *Bacillus*. En

este trabajo se comparó también el crecimiento de la microalga sola respecto al cultivo con las bacterias, encontrando que el cocultivo con el consorcio bacteriano permite un incremento en la concentración celular de la microalga en un 30% con respecto al cultivo solo (Litchfield et al., 1969). Otros autores como Guo y Tong, 2014 evaluaron el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en cocultivo con *Pseudomonas*, reportando un aumento en la concentración celular de la microalga y un intercambio de nutrientes entre los microorganismos (Guo and Tong, 2014).

Estos cocultivos se emplean también para el tratamiento de aguas residuales (Valderrama et al., 2002; Guo and Tong, 2014), donde las bacterias a partir del oxígeno generado por la microalga, degradan la materia orgánica presente en el agua. Entre los compuestos que se eliminan con estos consorcios microalgas-bacterias se encuentran el petróleo, salicilatos, fenoles, amonio, nitratos entre otros (Safonova et al., 1999; De-Bashan et al., 2002; Tamer et al., 2006; Subashchandrabose et al., 2011). Otras aplicaciones son la producción de compuestos de interés industrial como carotenoides, lípidos, proteínas, vitaminas, entre los otros (Walker et al., 2005; Derner et al., 2006; Spolaore et al., 2006), el uso de los microorganismos como alimento para humanos y animales, la producción de fertilizantes, biocombustibles. (Oswald and Benemann, 1976; de-Bashan et al., 2002; Liang et al., 2004).

Adicionalmente, estos cocultivos se han utilizado como un modelo simplificado para el estudio de la interacción planta-bacteria, debido a que la microalga comparte características de crecimiento y desarrollo con algunas plantas terrestres (de-Bashan et al., 2011). Se habla que las microalgas son similares entre 70-80% con las plantas (Devereux et al., 1990; de-Bashan et al., 2015) y además, ambas pertenecen al mismo grupo filogenético (Chlorobionta), por lo cual una célula de microalga se puede considerarse una planta.

Entre los mecanismos de promoción de crecimiento de plantas que se han evaluado con este modelo se encuentra la fijación de nitrógeno (Hernandez et al., 2009), la producción de ácido indolacético (De-Bashan et al., 2008) y solubilización de fosfato (De-Bashan et al., 2002). En estos estudios se ha encontrado que, por ejemplo, al inocular la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 con *Azospirillum brasilense* Cd, una cepa reconocida por ser PGPB para numerosas especies vegetales, se favorece el crecimiento microalgal entre 20% y 45%.

El objetivo de esta parte del proyecto fue determinar los efectos de la interacción microalga-PGPB, por lo cual se evaluaron cocultivos de los microorganismos *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 se empleó el medio BBM libre de nitrógeno con el fin de evaluar el crecimiento de los microorganismos sin una fuente de nitrógeno disponible.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

En los experimentos se utilizó la cepa *B. subtilis* EA-CB0575 cepa previamente evaluada en diferentes especies vegetales y reportada como PGPB (Posada-Urbe et al., 2015). La bacteria se almacenó en medio TSB ("Tryptic Soy Broth" - Merck Millipore) con 20% v/v de glicerol en viales 2 mL a -80°C y se activó en medio TSA 50% ("Tryptic Soy Agar", Merck) por 24 h a 30°C, antes de cualquier uso experimental. Se usó la cepa de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 la cual se almacenó en medio BBM-agar, y se activó en BBM por 7 días a 30°C, 100 rpm y fotoperíodo de 12 h luz /12 h oscuridad.

3.3.2 Medios de cultivo y reactivos

Para evaluar la promoción de crecimiento de la microalga se usó el medio BBM ("Bristol Bold Modified"), compuesto por (mg/L) NaNO_3 : 250; $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 200; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 75; K_2HPO_4 : 75; KH_2PO_4 : 175; NaCl : 25; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 4.98; H_3BO_3 : 11.42; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 8.8; $\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.44; MoO_3 : 0.71; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1.57; $\text{Co (NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.49 (UTEX), el medio se ajustó a un pH de 6.8. Este medio es normalmente usado para el crecimiento de *Chlorella* spp. Para el almacenamiento de la microalga se usó el medio BBM-agar de composición (g/L) NaNO_3 : 0.25; $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0.075; K_2HPO_4 : 0.075; KH_2PO_4 : 0.175; NaCl : 0.025; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.0049; H_3BO_3 : 0.01142; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.0088; $\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.00144; MoO_3 : 0.00071; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.00157; $\text{Co (NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.00049; Agar: 10 (UTEX, 2007).

3.3.3 Cultivo de *Chlorella sorokiniana* en vida libre y determinación de cinética de crecimiento

El microorganismo *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 se cultivó en medio BMM-Agar durante 5 días a 30°C con fotoperiodos 12/12. Se inoculó una colonia del microorganismo en 50 mL de medio BMM, incubando 5 días a 30°C con fotoperiodo 12/12 horas a 100 rpm. El cultivo obtenido se centrifugó a 4500 rpm por 10 minutos y el pellet se resuspendió en medio BBM libre de nitrógeno hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 células/mL, debido a que esta concentración es la normalmente reportada para los cultivos de *Chlorella spp.* en cultivos autotróficos (Camacho et al., 2004a). Se verificó la pureza de cultivo visualizando la microalga en cámara de Neubauer. Posteriormente, 20 mL de la suspensión se inocularon en 80 mL medio BMM libre de nitrógeno estéril, contenido en un Erlenmeyer de 500 mL a 30°C con fotoperiodo 12/12 horas a 100 rpm por 8 días.

Se midió diariamente la densidad celular (células/mL) mediante el conteo en cámara de Neubauer y se realizaron las curvas de crecimiento en el tiempo durante 8 días. Además, se evaluó el tamaño de la microalga al octavo día, mediante la medición del área superficial de la microalga usando la herramienta de ensayo Countour del Programa Zen 2012 (Blue Edition) de Carl Zeiss Microscopy acoplado al microscopio de Axiostar Plus del laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT, usando el objetivo 100x. Los ensayos se realizaron por triplicado, en tres tiempos independientes.

3.3.4 Cultivo de *Bacillus spp.* y cinética de crecimiento bacteriano en vida libre

Bacillus spp. se cultivó en TSA 50% durante 24h a 30°C, se tomó una colonia y se inoculó en 50 mL de medio TSB en un Erlenmeyer de 250 mL durante 18 horas a 30°C y 120 rpm. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4500 rpm y el pellet se resuspendió en BBM libre de nitrógeno hasta una densidad optica de 1.0 a 600nm. Se tomaron 10 mL de la suspensión y se inocularon en 90 mL de BBM libre de nitrógeno en un Erlenmeyer de 500 mL, agitando a 120 rpm y 30°C durante 8 días. En este tiempo se midió la densidad celular diariamente mediante el método de tinción con CFSE (ver numeral 3.3.5) por 8 días.. Los ensayos se realizaron por triplicado, en tres tiempos independientes.

3.3.5 Medición de la densidad celular bacteriana por el método de tinción con CSFE (diacetato de carboxifluoresceína)

Este método es una modificación al método propuesto por Bloem (1995), para el conteo celular tiñendo con FDA (diacetato de fluoresceína). Para ello, 1 mL de cultivo de la bacteria se centrifugó a 10000 rpm por 3 minutos, el pellet se lavó tres veces en solución de buffer fosfato (PBS) de composición (g/L): NaCl , 8; KCl, 0.2; Na₂HPO₄, 1.44; KH₂PO₄, 0.24; y se ajustó el pH a 7.4 con HCl. Posteriormente, a un volumen de 0.1 ml de la suspensión en PBS, se le adicionaron 0.5 µL de solución 10 mM de CSFE (diacetato de carboxifluoresceína, Life technologies) disuelta DMSO, y la mezcla se llevó a un horno por 10 min a 37 °C. Luego de la incubación, se tomó un portaobjetos y se le adicionó 10 µL del cultivo con CFSE y se cubrió con un portaobjetos de área conocida (484 mm²). La muestra se visualizó empleando el microscopio Axioscope 1 en el objetivo de 100X, empleando una lámpara de fluorescencia halógena HXP 120V. Las muestras se visualizaron con el filtro Cy3 a 500 ms y con toda la intensidad de la fuente de luz. Se empleó el software Zen 2014 versión 5.2 para la toma de fotografías y se contó el número de células en 10 campos visuales, y a partir de este conteo se encontró la concentración celular como se muestra en la ecuación 3.1.

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\frac{\text{Área del cubreobjetos (mm}^2\text{)}}{\text{Área de campo visual (mm}^2\text{)}} * \text{Promedio del conteo}}{10 \mu\text{L}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \quad (3.1)$$

3.3.6 CO-CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* Y *Bacillus* spp. EN VIDA LIBRE

Con el fin de determinar si *B. subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento *C. sorokiniana* UTEX1230, se prepararon cultivos de 10 mL de la microalga y 10 mL de la bacteria, como se menciona en los numerales 3.3.3 y 3.3.4, y se adicionaron a 80 mL de medio BBM libre de nitrógeno. Este se incubó por 8 días a 30°C con fotoperíodo 12/12 horas y 100 rpm, tiempo durante el cual se midió la densidad celular de la microalga y la bacteria, por cámara de Neubauer y tinción con CSFE, respectivamente. Adicionalmente, al finalizar el

experimento se midió el área de la microalga usando protocolo descrito en el numeral 3.3.3. Se reportaron además los valores de densidad celular en el tiempo durante 8 días. Los ensayos se realizaron por triplicado, en tres tiempos independientes.

3.3.7 Modelamiento matemático del crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en crecimiento individual y en cocultivo con *B. subtilis*

Los datos de densidad celular en el tiempo para los cultivos de *C. sorokiniana* cultivada individualmente y en cocultivo con *B. subtilis* se modelaron por medio del modelo exponencial. Para ello se graficó el logaritmo natural de la densidad celular (X) vs. el tiempo (t) y se determinaron las etapas de crecimiento de los microorganismos. A partir de la linealización del modelo exponencial (ecuación 3.2) se determinó la velocidad específica del crecimiento (μ_x) (d^{-1}) y el tiempo de duplicación (t_d) (días) de la bacteria *B. subtilis* EA-CB0575 (ecuación 3.3). Además se evaluó el modelo logístico (ecuación 3.4), con ayuda del programa Polymath V.5.

$$\ln(X) = \mu_x t + \ln X_0 \quad (3.2)$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_x} \quad (3.3)$$

$$X = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \frac{X_0}{X_\infty} (1 - e^{\mu t})} \quad (3.4)$$

* X_0 = Concentración inicial del cultivo (células/mL); X_∞ = concentración máxima (células/mL)

3.3.8 Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI, con un nivel de confianza de 95%. Se usó un diseño unifactorial para evaluar los datos de las variables de respuesta densidad celular de la microalga y bacteria, y el tamaño de la microalga. Los tratamientos evaluados fueron cultivo de microalga sola (numeral 3.3.3), cultivo de la bacteria sola (numeral 3.3.4) y el cocultivo de ambos microorganismos (numeral 3.3.6).

Para las evaluaciones de promoción de crecimiento de la microalga en cocultivo con *Bacillus subtilis*. y sus respectivos controles de trabajo, se evaluaron los supuestos de la

tabla ANOVA: normalidad de residuos, igualdad de varianza e independencia de los residuos por medio de los test de Shapiro-Wills y Kolmogorov, Levene y la gráfica de residuos vs orden de corrida, respectivamente. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos, se usaron la tabla ANOVA y la prueba de rango múltiples LSD.

3.4 Resultados

3.4.1 Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 en cocultivo con *Bacillus subtilis* EA-CB0575

Con el fin de determinar si *B. subtilis* promueve el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* se evaluó su crecimiento de *C. sorokiniana* en cocultivo con *B. subtilis* en medio BBM sin nitrógeno. Además se evaluó el crecimiento de la microalga individualmente como control absoluto al cocultivo. Se encontró que la microalga en cocultivo crece en mayor proporción que en cultivos sin la presencia de la bacteria, lo que se pudo evidenciar y por medio de la concentración celular y el tamaño de la microalga.

En la Figura 3.2, se puede observar que al inicio del experimento no se evidenciaba diferencias en el color entre los tres tratamientos, mientras transcurría el tiempo del ensayo se vio un leve aumento en la coloración del cultivo de microalga y un aumento claro en el cocultivo microalga-bacteria, debido al aumento en la concentración celular (células/mL) de la microalga.

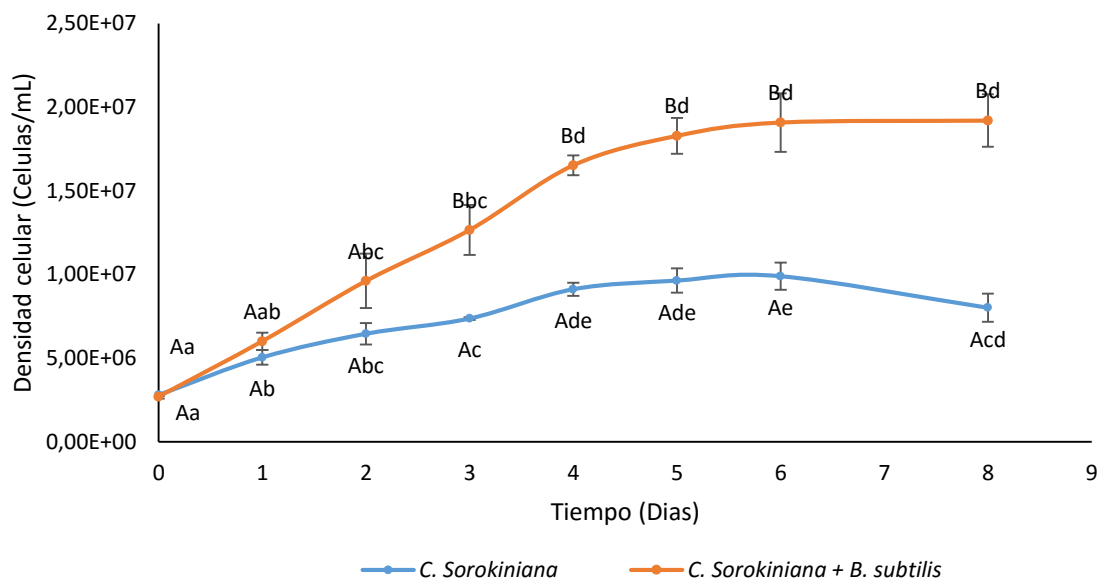
Figura 3-2 Seguimiento fotográfico del crecimiento de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 en cocultivo con *Bacillus subtilis* EA-CB0575. De izquierda a derecha en cada fotografía: Cultivo de la Microalga, cocultivo microalga-bacteria y cultivo de la bacteria.



En el cultivo de *C. sorokiniana* inoculada con *B. subtilis* se encontró que la densidad celular de la microalga alcanzó una concentración celular de $1,92 \times 10^7$ células/mL luego de 8 días de crecimiento, mientras en el tratamiento de *C. sorokiniana* inoculada individualmente alcanzó una densidad de $9,89 \times 10^6$ células/mL. Esto implica que en cocultivo, la microalga crece 94% más que en cultivo sin bacterias (Figura 3-3). A continuación se presenta la cinética de crecimiento para *C. sorokiniana* UTEX1230 en crecimiento individual y en cocultivo con *B. subtilis* EA-CB0575

Se evidenció que durante los dos primeros días de crecimiento no hubo diferencias entre los dos tratamientos evaluados (Valor-P= 0.1453). A partir del tercer día se comenzaron a evidenciar diferencias en la concentración celular de la microalga entre los tratamientos (Valor-P= 0.0238). Posterior al día cuatro de cultivo no se presentan variaciones significativas en la densidad celular de los tratamientos, indicando que en este punto es donde comienza la fase estacionaria. Los cultivos no presentaron fase de latencia y la fase exponencial tiene una duración 4 días, desde 0 a 4

Figura 3-3 Cinética de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 en cocultivo con *Bacillus subtilis* EA-CB0575



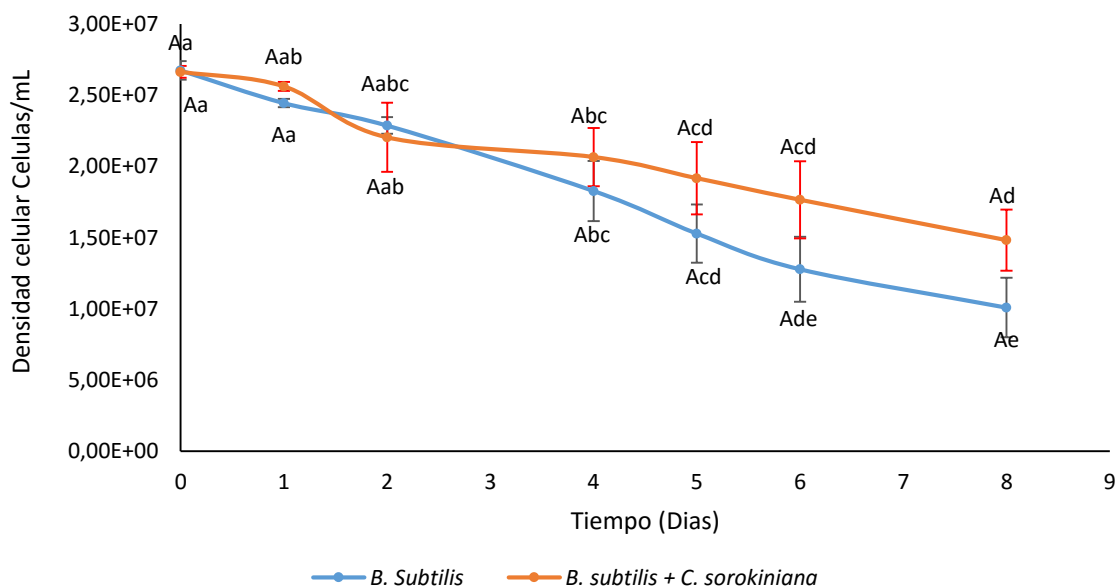
*La letra minúscula indica diferencias significativas entre los puntos de cada tratamiento, la mayúscula indica diferencia significativa entre mismo ciclo. Las diferencias significativas se encontraron con ANOVA-unifactorial, con valor-P < 0.05, y de acuerdo al Test de LSD de rangos múltiples

3.4.2 Crecimiento de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en cocultivo con *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230

Para determinar si *B. subtilis* se ve afectada cuando crece en cocultivo con *C. sorokiniana*, se evaluó su crecimiento de *B. subtilis* en cocultivo con *C. sorokiniana* en medio BBM sin nitrógeno por medio de la evaluación de la densidad celular (células/mL). Se usó este medio para favorecer la fijación de nitrógeno debido a que no contiene nitrógeno disuelto. Además se determinó el crecimiento de la bacteria sola como control al cocultivo y en el mismo sistema.

En ambos tratamientos se evidenció una reducción de la densidad celular de la bacteria luego de ocho días. En este mismo tiempo se alcanzó una densidad celular de 1.5×10^7 células/mL en el cocultivo, mientras que la bacteria sola alcanzó una densidad celular de 1.01×10^7 células/mL. Durante los 8 días de evaluación no se evidenció diferencias significativas entre los tratamientos (Valor- $P > 0.05$) (Figura 3-4).

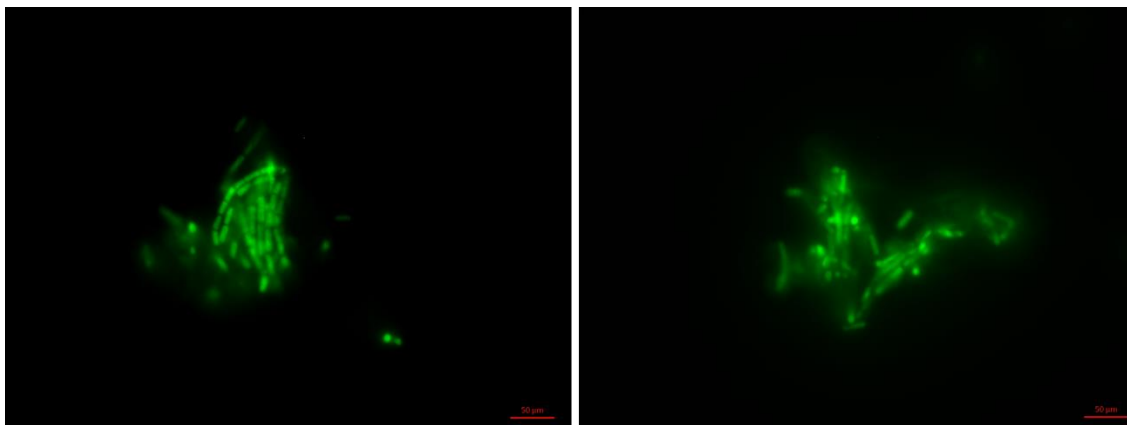
Figura 3-4 Cinética de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 en cocultivo con *Bacillus subtilis* EA-CB0575



*Letras minúsculas indican diferencias significativas entre los puntos de cada tratamiento, mayúsculas indican diferencia significativa entre mismo ciclo. Las diferencias significativas se encontraron con ANOVA-unifactorial, con valor- $P < 0.05$, y de acuerdo al Test de LSD de rangos múltiples

La medición de la biomasa bacteriana se realizó con el método de tinción con CSFE, en este se podía observar las bacterias y las microalgas separadas, un ejemplo de cómo se visualiza el microorganismo se muestra en la Figura 3-5. En la microscopia se puede apreciar las bacterias coloreadas en color verde.

Figura 3-5 Microscopia de fluorescencia de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 (100x) luego de 5 días de cultivo en BBM modificado sin nitrógeno



3.3.1 Efecto en el tamaño de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 en cocultivo con *Bacillus subtilis* EA-CB0575

Con el fin de evaluar si inocular *C. sorokiniana* con *B. subtilis* afecta el tamaño celular de la microalga, se determinó el área de la microalga cuando esta se sembrada sola y en cocultivo con la bacteria. Para esto se tomaron los datos de 30 células por tratamiento de forma aleatoria y se determinó el promedio de los valores de las variables de respuesta, lo cual se presenta en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Tamaño de la microalga *C. sorokiniana* en μm^2 , en el cocultivo con la bacteria *B. subtilis* e individualmente en medio BBM sin nitrógeno

	Tamaño (μm^2)			Tamaño Promedio (μm^2)	Error (μm^2)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
<i>C. sorokiniana</i>	2,28	2,03	1,79	2,03	0,14
<i>C. sorokiniana</i> + <i>B. subtilis</i>	9,04	8,44	10,52	9,33	0,62

Según los resultados presentados se determinó que la microalga en cocultivo alcanzó un tamaño 4,5 veces mayor (equivalente a un 450% de aumento) con respecto a su cultivo sin la bacteria, alcanzando un área de $9,33 \mu\text{m}^2$, mientras que el microorganismo sólo alcanzó un área de $2,03 \mu\text{m}^2$. Esto se presenta en las Figura 3-6 y Figura 3-7

Figura 3-6 Microscopia de *Chlorella sorokiniana* (100x) luego de 8 días de cultivo en BBM modificado sin nitrógeno

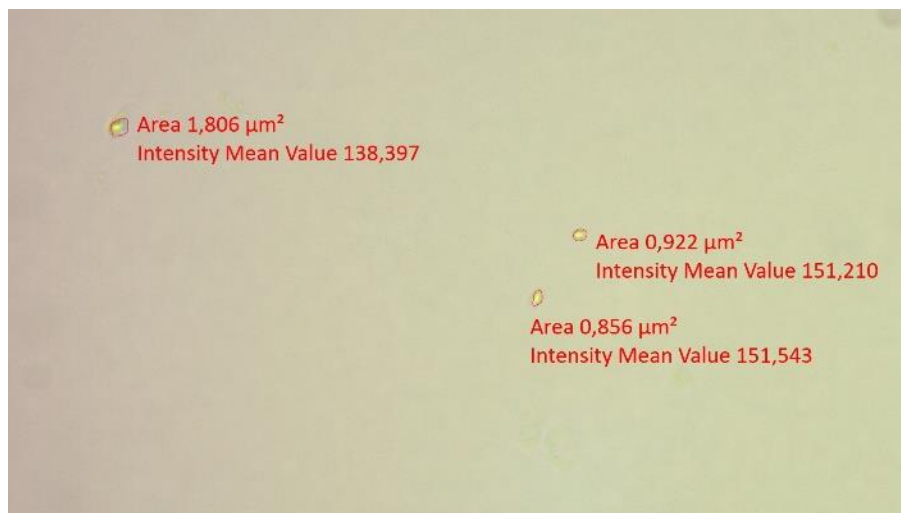
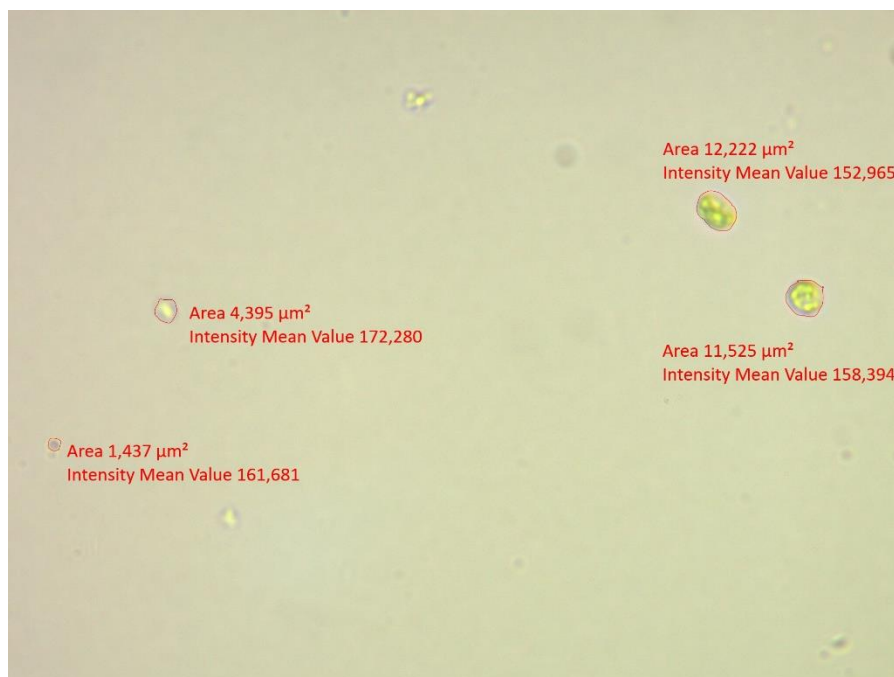


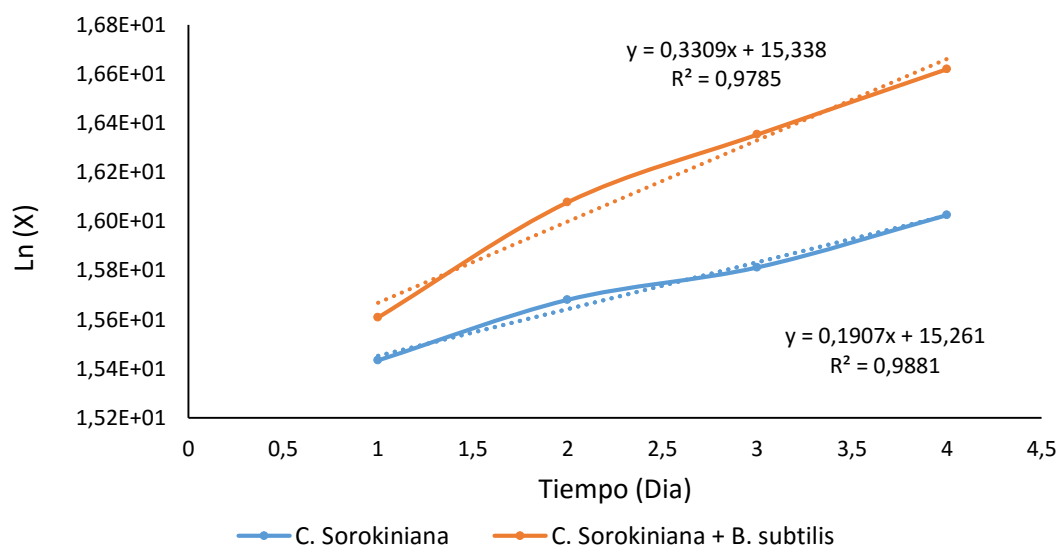
Figura 3-7. Microscopia de *Chlorella sorokiniana* en cocultivo con *Bacillus subtilis* (100x) luego de 8 días de cultivo en BBM modificado sin nitrógeno



3.3.2 Modelamiento matemático de *Chlorella sorokiniana* en crecimiento individual y en cocultivo con *B. subtilis*

Para determinar los parámetros cinéticos de la microalga individualmente y en cocultivo se realizó el modelamiento matemático para los datos del crecimiento de la microalga en ambos tratamientos, en medio sin nitrógeno, para ello se usó el modelo exponencial (ecuación 3.2) y el modelo logarítmico (ecuación 3.4). En el caso de la bacteria no fue posible realizar un modelamiento matemático debido a que no hubo crecimiento en el tiempo del experimento. Por el contrario, hubo una disminución de la densidad celular en el tiempo. Se graficó el logaritmo natural de la densidad celular (células/mL) vs el tiempo (días) para determinar las etapas de crecimiento microalgal (Figura 3-8). Se encontró que la etapa exponencial empezó en el día uno y se prolongó hasta el día cuatro, donde empieza la etapa estacionaria. Esto es consistente con lo encontrado en el análisis estadístico del numeral 3.4.1 donde luego del cuarto día de crecimiento no hubo cambios en la densidad celular de la microalga.

Figura 3-8 Linealización del modelo exponencial durante la etapa exponencial del crecimiento de *C. sorokiniana* con y sin cocultivo con *B. subtilis*



*X= densidad celular en células/mL

Con los datos obtenidos de la linealización del modelo exponencial se determinaron los valores de velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) (d^{-1}) y tiempo de duplicación (días) (Tabla 3-2) Se determinó que la velocidad específica en cocultivo fue 73% mayor que el control absoluto. Además, el tiempo de duplicación de la microalga en cocultivo fue un 57% del tiempo de duplicación de la microalga sola.

Tabla 3-2. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para *C. sorokiniana* en cocultivo con *B. subtilis*

Tratamiento	$\mu_x (d^{-1})$	td (h)
<i>C. sorokiniana</i>	0.19	3.64
<i>C. sorokiniana</i> + <i>B. subtilis</i>	0.33	2.09

Debido a que los valores encontrados con el modelo logístico no fueron consistentes entre ensayos en el tiempo, no se tuvieron en cuenta para el análisis de esto. Además el modelo exponencial es más adecuado para la modelación de los cultivos ya se obtuvo un R^2 mayor al 95%. En trabajos anteriores De Bashan et al (2008) ha usado modelo exponencial para la evolución de los parámetros cinéticos en cultivos de microalgas como en cocultivo microalga-bacteria.

3.5 Discusión

Este objetivo buscaba determinar si la PGPB *Bacillus subtilis* EA-CB0575, ya probada en cultivos como banano, café, flores, hortalizas, presenta sus efectos de promoción del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230. Esto con el fin de aportar al estudio de comportamiento eucariota-procariota, empleando la microalga como modelo de vegetal unicelular. Además, considerando este sistema como una opción para el cultivo de microalgas para diferentes fines, debido al aumento en la concentración celular, productividad, entre otros. En los diferentes experimentos realizados se determinó que la microalga aumentó su densidad celular en un 94% cuando se inoculó con la bacteria, en comparación con la microalga creciendo sola en el mismo medio. Esto indica que al inocular la microalga con la bacteria, esta última promueve el crecimiento de la microalga. Este resultado es compatible con el efecto que se ha encontrado en trabajos del grupo de

investigación con el mismo PGPB en diversas especies vegetales (Gaviria and Zazini, 2014; Posada-Urbe et al., 2015)

Diferentes autores han reportado resultados similares empleando otras cepas de microalga y diferentes especies de bacterias. De-Bashan et al. (2008) determinaron que al inocular *C. sorokiniana* UTEX 2805 inmovilizada en alginato con *Bacillus pumilus* ES4 en medio C30, libre de nitrógeno, se aumentaba la densidad celular de la microalga en un 30%. Adicionalmente, al inocular *Azospirillum brasiliense* Cd, una cepa reconocida como promotora del crecimiento microalgar, en este mismo medio se aumentó la concentración de la microalga en un 35%. Ese trabajo se realizó para proponer el estudio de modelo microalga-bacteria como una alternativa para la evaluación del modelo planta-bacteria.

Por su parte, en estos sistemas de cultivo se ha determinado que la cepa tiende a crecer en poca medida o mantener su densidad celular en el tiempo (de-Bashan et al., 2008; Hernandez et al., 2009; Ruiz-Marin et al., 2013; Guo and Tong, 2014). Sin embargo, para el caso de nuestro estudio, se encontró una disminución en la concentración celular de la bacteria en el tiempo cuando se sembraba sola y en cocultivo con la microalga.

En cuanto al tamaño de *C. sorokiniana* se encontró un aumento considerable en el área superficial de la célula cuando se cultivó con *B. subtilis*. De Bashan et al. (2005) reportaron que al inocular *C. vulgaris* UTEX 2714 con *A. brasilense* Cd, el tamaño celular de la microalga no cambió significativamente con respecto a la bacteria inoculada sola y tampoco hubo cambios en la composición celular de esta. Sin embargo, en otras de sus investigaciones, estos mismos autores si reportan aumentos en el tamaño celular de la microalga *Chlorella vulgaris* 395 en cocultivo con *A. brasilense* Cd, con aumentos considerables en el tamaño de la célula entre 2.8 y 4.6 μm de diámetro. (de-Bashan et al., 2002)

En este estudio se determinó la velocidad específica de crecimiento de la microalga tanto para cocultivo como en cultivo individual. Se determinó que este parámetro cinético varía entre 0,19 d^{-1} cuando crece sola y 0,33 d^{-1} cuando está en cocultivo. Esto indica un aumento en la velocidad específica de crecimiento un 73%. Y esto es consistente con los reportes que presentan valores similares a los obtenidos aquí. De-bashan et al. (2008) determinó que para cultivo de *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805 sola y en cocultivo con *A. brasilense*

Cd, la velocidad de crecimiento varió entre $0,14 - 0.24 \text{ d}^{-1}$ para la microalga sola y entre $0.22 - 0.48 \text{ d}^{-1}$ para el cocultivo, indicando un aumento promedio de 200%.

En este proyecto se observó que la bacteria *Bacillus subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230. Sin embargo, el mecanismo por el cual se presenta este aumento en el crecimiento aún no ha sido determinado. Los resultados de la primera parte del trabajo junto con evaluaciones previas de las capacidades bioquímicas de la cepa a nivel *in vitro* podrían indicar que la fijación de nitrógeno, la producción de ácido indol acético y la producción de sideróforos podrían ser algunos de los mecanismos vinculados al mejoramiento en el crecimiento y desarrollo de la microalga.

3.6 Conclusiones

En este estudio se determinó que cocultivar *C. sorokiniana* con *B. subtilis* EA-CB0575 aumentó la concentración celular de la microalga en comparación con el cultivo de ella sola en medio BBM sin nitrógeno, por lo cual se puede decir que la bacteria promueve el crecimiento microalgar. Además, en cocultivo la bacteria aumentó el área en un 450% y sus parámetros cinéticos de la microalga en un 73% comparado con el cultivo de la microalga sola. No se puede aún determinar el mecanismo de promoción, por lo cual se recomienda el uso de técnicas especializadas para este objetivo.

Capítulo 4: Determinación de fijación de nitrógeno por el método de reducción acetileno-etileno

4.1 Resumen

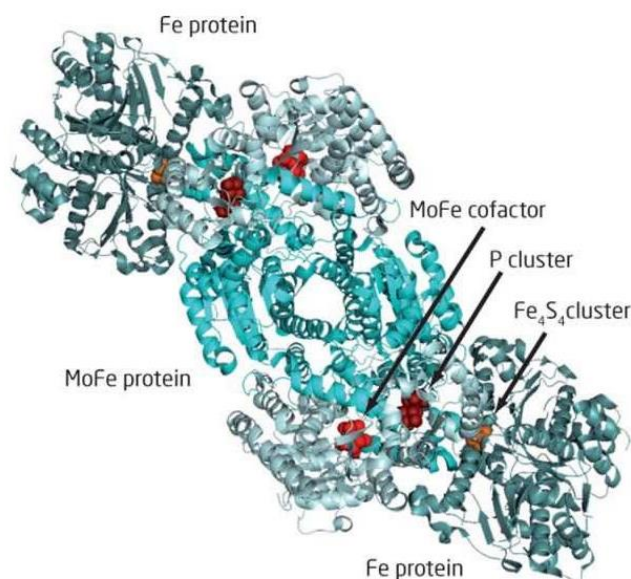
Este trabajo se realizó con el fin de determinar si la fijación de nitrógeno es uno de los mecanismos por el cual *Bacillus subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 a nivel de Erlenmeyer y en medio de cultivo BBM libre de nitrógeno. Se empleó la metodología ARA (por sus siglas en inglés, “acetylene reduction assay”), la cual es una metodología que permite determinar si la enzima nitrogenasa, enzima encargada de la fijación biológica de nitrógeno, se encuentra activa en el cultivo microbiano y permite la reducción del acetileno a etileno. Se evaluó la cantidad de etileno generada en cultivos de la bacteria y la microalga individuales y la producción de este gas en cocultivo. Se encontró que las bacterias A320, *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y *Azospirillum brasilense* Cd, en medio NFb y *Bacillus subtilis* EA-CB0575, en medio BBM libre de nitrógeno, redujeron acetileno en etileno, por lo cual se sugiere que estos microorganismos fijan nitrógeno atmosférico por vía biológica. Se determinó que en el cocultivo *Bacillus subtilis* EA-CB0575 con *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 también hay producción de etileno cuando se siembran los microorganismos en evaluación en medio BBM libre de nitrógeno en una atmósfera de acetileno, por lo cual se sugiere que la bacteria fija nitrógeno también en cocultivo.

4.2 Introducción

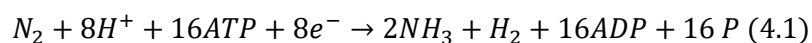
La enzima nitrogenasa se encuentra en bacterias y arqueas, y cataliza la fijación de nitrógeno por vía biológica (Seefeldt et al., 2013). Esta enzima está presente en los

organismos fijadores y diversos estudios filogenéticos han concluido que estos se derivan de un ancestro común (Staal et al., 2001). Esta enzima representa cerca del 10% de las proteína de las células donde se encuentra (Berman-Frank et al., 2003) y consiste en un complejo de dos enzimas muy sensibles al oxígeno, las cuales se componen así: El primer complejo (complejo I) está formado por dos subunidades de α -proteínas, dos de β -proteínas, 24 moléculas de hierro, 2 de molibdeno y un cofactor llamado FeMoCo. Por su parte el complejo II tiene dos α -proteínas y moléculas de hierro. Para que la fijación sea exitosa, deben presentarse los dos componentes además de tener un ambiente en presencia de magnesio y ATP, debido a que el proceso consume energía (Glick and Pasternak, 1998)

Figura 4-1 Modelación 3D de la enzima nitrogenasa (Anderson, 2013)

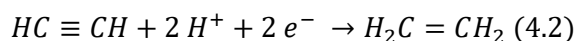


Existen varios tipos de enzima, en las que la composición general es igual, pero el molibdato puede ser reemplazado por vanadio o hierro y su actividad catalítica suele ser menor (Miller and Eady, 1988; Seefeldt et al., 2013). La reacción general de fijación de nitrógeno se presenta a continuación (Glick and Pasternak, 1998) (Ecuación 4.1).



Para que este proceso se lleve a cabo se requiere de la presencia de otras proteínas que regulan actividades en las células, lo que hace a que este proceso sea muy complejo (Glick and Pasternak, 1998)

Se ha reportado que la nitrogenasa es capaz de reducir otras moléculas diferentes al nitrógeno diatómico, principalmente compuestos carbonados cortos como el acetileno, propileno, buteno, ciclopropeno, alcohol propargílico, entre otros (Seefeldt et al., 2013) Esta capacidad de la enzima fue determinada por Schöllhorn et al. (1967) y estudiada por Dilworth (1966) quien encontró que la reacción de reducción de acetileno era análoga a la fijación de nitrógeno. Estos estudios fueron la materia prima para que Hardy et al. (1968) desarrollara un método de cuantificar la fijación de nitrógeno, usando la reacción de reducción de acetileno, debido a que este gas y el etileno eran fácil de detectar y cuantificar con la ayuda de un cromatógrafo de gases y hasta el momento ha sido el método más ampliamente empleado, se le conoce como método de reducción de acetileno (ARA, por el nombre en inglés “Acetylene reduction assay”). La reacción general para la reducción de acetileno se presenta a continuación (Ecuación 4.2) (Seefeldt et al., 2013)



El método ha sido sugerido para la detección de la enzima debido a sus múltiples virtudes: es económico, rápido, sensible y preciso (Witty and Minchin, 1988). Rápidamente, el método se basa en crecer el organismo en una atmosfera con acetileno, para que se convierta en etileno, el cual luego se cuantifica y se extrapola en cantidad de nitrógeno fijado. Se ha reportado que por cada mol de etileno producido se fijan aproximadamente 0.33 moles de N_2 (Hardy et al., 1968; Hardy et al., 1973; Flett et al., 1976), aunque algunos autores difieren en este número debido a que no se tiene en cuenta la inhibición parcial de la nitrogenasa por parte del acetileno (Herridge et al., 2008).

Autores como Staal et al., 2001 han empleado este método para medir la fijación de nitrógeno en cianobacterias, Dilworth, 1966; Dalton and Whittenbury, 1976; Eckert et al., 2001) para medir esta actividad en bacterias y autores como Fishbeck et al., 1973; Zuberer and Silver, 1978; Mascarua-Esparza et al., 1988 en plantas. Específicamente, Xie et al., 1998 han reportado este método para evaluar la fijación de nitrógeno en *Bacillus* spp. En cocultivo microalgas-bacterias también se ha reportado el uso de ARA para evaluar fijación de nitrógeno. Hernández et al. (2009) evaluó la fijación de nitrógeno en el cocultivo inmovilizados de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 con *Bacillus pumilus* ES4 en medio SGM

libre de nitrógeno, encontró que la bacteria sola y en cocultivo fijaba nitrógeno. Gonzalez et al. (2000) evaluó la fijación de nitrógeno en cocultivo inmovilizado de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 con *Phyllobacterium myrsinacearum*, se determinó que la bacteria fijaba nitrógeno entre 285 y 360 $\mu\text{mol/UFC mL}$.

Este capítulo tiene como finalidad de determinar si la fijación de nitrógeno es uno de los mecanismos por el cual *Bacillus subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 a nivel de matraz y en medio de cultivo BBM libre de nitrógeno, para lo cual utilizó método ARA.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Microorganismos y reactivos

En este trabajo se usaron los microorganismos *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230. Se emplearon además las cepas A320 (Suárez-Mesa, 2014) y *Azospirillum brasilense* Cd, como controles positivos fijadores de nitrógeno (Holguin and Bashan, 1996). Todos los microorganismos se activaron y se almacenaron como se mencionan en los capítulos anteriores numerales 2.3.1 y 3.3.1. Para el ensayo de fijación se usó Acetileno grado industrial, pureza 98,5% (Cryogas) almacenado en bolsa Tedlar de 5L. El etileno se produjo a nivel de laboratorio por medio del siguiente proceso:

A 20 mL de etanol se adicionaron 2g de sulfato de cobre (Merck Millipore) y 20 mL de ácido sulfúrico y se calentó la solución a 100°C en plancha de calentamiento. Por medio de este proceso se obtiene etileno más vapor de agua. Con el fin de eliminar el vapor se pasó el gas obtenido por una columna de condensación y el gas seco se almacenó en una bolsa Tedlar (SKC) de 5 L hasta su uso.

4.3.2 Evaluación de fijación de nitrógeno por método ARA

Con el fin de determinar la fijación de nitrógeno atmosférico de los diferentes microorganismos en evaluación se empleó el método de reducción acetileno-etileno el cual usa la cromatografía de gases como principio de cuantificación. En este método se midió si el organismo tiene la capacidad de reducir el acetileno a etileno por medio de la acción de la enzima nitrogenasa (Bashan et al., 1989).

Para todos los ensayos de este capítulo se usó el cromatógrafo de gases del Laboratorio de Química Instrumental de la Universidad EAFIT Autosystem XL de Perkin Elmer, acoplado con un detector de flama ionizada (FID) de hidrogeno, operando a las siguientes condiciones: Columna TRB-WAX 30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m (Teknokroma, Serial: NF-3254), la temperatura de columna a 50°C, temperatura del inyector de 120°C, temperatura de detector 120°C. Se empleó como gas acarreador N₂ a una presión de 6.0 psi, y un Split de 100 mL/min. Estas condiciones fueron adaptadas del método empleado por Holguin et al. (1992). Se realizaron corridas de 0.5 mL de acetileno y etileno puros independiente por el equipo para verificar los tiempos de retención de cada uno. Además de un mezcla de 0.5mL de cada uno de los gases para determinar si se pueden diferenciar los picos de cada uno de los gases.

Se reportaron los cromatogramas con los tiempos de detección y la concentración de etileno y acetileno por medio de la relación de los resultados con las curvas de calibración.

4.3.3 Curvas de calibración etileno y acetileno

Para elaborar las curvas de calibración del etileno y el acetileno en las condiciones de operación del numeral 4.3.2, se inyectaron diferentes cantidades (0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 y 2.0 mL) de cada uno de los gases de forma independiente, a frascos herméticamente sellados de 26 mL, que cotenian 10 mL de agua destilada estéril. De cada frasco se tomaron 0.5 mL de muestra la cual se inyectó al cromatógrafo. Con el fin de calcular las moles de gas que se inyectaron al equipo, se multiplicó la concentración de cada frasco (mol/mL) por la cantidad de gas inyectada y para determinar la concentración en cada frasco (C_F) se usó la ecuación 4.3. Luego se graficaron las moles de cada gas versus el área reportada en el equipo y se halló el coeficiente de determinación para validar la precisión de la curva. Sólo se aceptaron curvas que tuvieran un coeficiente mayor 95%

$$C_F \left(\frac{\text{mol}}{\text{mL}} \right) = \frac{V_I \times \rho_G}{PM_G \times 26 \text{ mL}} \quad (4.3)$$

Dónde: V_I = volumen de gas inyectado a los frascos (mL), ρ_G = densidad del gas (g/mL), PM_G = Peso molecular del gas (g/mol).

4.3.4 Fijación de nitrógeno por método ARA en medio NFb

Este ensayo se realizó para verificar si el método ayuda a identificar fijación de nitrógeno antes de ser usado en el cocultivo en medio BBM sin nitrógeno, para lo cual se evaluaron bacterias previamente evaluadas en los ensayos de tamizaje presentados en el capítulo 2. Las cepas seleccionadas fueron *B. subtilis* EA-CB0575 como bacteria PGPB para el cocultivo y los controles positivos A320 y *A. brasilense* Cd. Esta última cepa ha sido previamente evaluada con este método con resultados positivos para la fijación (Bashan et al., 1989). Se realizaron los ensayos en medio NFb, el cual ha sido previamente usado para realizar método ARA (Mascarua-Esparza et al., 1988), posteriormente los ensayos se hicieron en medio BBM sin nitrógeno, por ser el medio de interés para el crecimiento de la microalga en cocultivo.

Para las evaluaciones en medio NFb se prepararon cultivos de las 3 bacterias como se describe en el numeral 2.3.3 y se incubaron durante 7 días a 30°C. Luego, se le retiró 10% del volumen de aire y se reemplazó con acetileno, incubando durante media hora. Posteriormente se inyectaron al cromatógrafo 0.5 mL de gas de cada frasco y se realizó una corrida de 3 minutos tiempo en el equipo.

Por medio de los cronogramas obtenidos se determinó la cantidad de moles de etileno obtenidas y se realizó el mismo procedimiento a frascos con medio NFb sin bacterias, como control negativo al método.

4.3.5 Evaluación de la fijación de nitrógeno en cocultivos de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 -*Bacillus subtilis* EA-CB0575 por método ARA

Para evaluar la fijación de nitrógeno del cocultivo microalga-bacteria PGPB se empleó un diseño unifactorial, con los tratamientos que se muestran en la Tabla 4-1. Este experimento se realizó por triplicado y se repitió tres veces en tiempos independientes.

Tabla 4-1 Tratamientos que empleados para la evaluación de la fijación de nitrógeno por método ARA.

Tratamiento	Descripción
Control absoluto	Frascos con Medio <i>BBM sin nitrógeno</i>
Cultivo de <i>C. sorokiniana</i>	Frascos con medio <i>BBM sin nitrógeno</i> y <i>C. sorokiniana</i> a una concentración de 1×10^8 células/mL.
Cultivo de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	Frascos con medio <i>BBM sin nitrógeno</i> y cultivo de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 a una concentración de 1×10^8 células/mL
Co-cultivo de <i>C. sorokiniana</i> y <i>B. subtilis</i>	Frascos con <i>C. sorokiniana</i> y <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 a una concentración de 1×10^8 células/mL de cada microorganismo.

Para estas evaluaciones se prepararon 200 mL de cultivos puros de la microalga y la bacteria, además del cocultivo de ambos microorganismos en el mismo volumen, como se mencionan en los numerales 3.3.3, 3.3.4 y 3.3.6 respectivamente. Los cultivos se incubaron por 48 h a 30°C, 100 rpm y fotoperiodo 12 horas. Luego, se pasaron 10 mL cada cultivo a frascos de 26 mL herméticamente sellados, y se incubaron a 30°C, 100 rpm, fotoperiodo de 12 h durante 24 h.

Pasado el tiempo de incubación, al sistema se le retiró el 10% de volumen de aire y se sustituyó este volumen con gas acetileno con una jeringa. Los frascos se incubaron por 1 hora y se tomó muestras de la atmósfera del recipiente por medio de succión con jeringa en los tiempos 0, 0.5 y 1 hora y se inyectaron al cromatógrafo de gases para su análisis. Con los datos reportados por el equipo y las curvas de calibración (numeral 4.3.3) para cada uno, se determina la cantidad de moles de etileno y acetileno.

4.3.6 Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI, con un nivel de confianza de 95%. Para las evaluaciones de fijación de nitrógeno de la bacteria en cocultivo con la microalga y sus respectivos controles de trabajo, se empleó como variables

de respuesta: la concentración de etileno y acetileno. Se evaluaron los supuestos de la tabla ANOVA: normalidad de residuos, igualdad de varianza e independencia de los residuos por medio de los test de Shapiro-Wills y Kolmogorov, Levene y la gráfica de residuos vs. orden de corrida, respectivamente. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos, se usó la tabla ANOVA y la prueba de rango múltiples LSD. Se realizaron todos los ensayos con 3 réplicas y 3 veces en el tiempo.

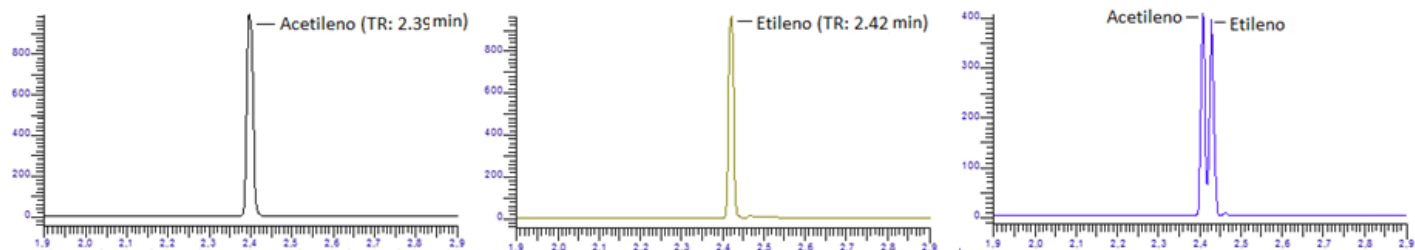
4.4 Resultados

4.4.1 Ensayos preliminares para estandarización del método

Con el fin de determinar de los tiempos de retención del acetileno y etileno puros y si se podían separar con el equipo, se inyectó 0.5 mL de cada uno de los gases independientemente y una mezcla de 0.5 mL de cada uno de los gases al cromatógrafo, se visualizaron los tiempos de retención para cada uno de los gases (Figura 4-2).

Se determinó que el tiempo de retención del acetileno y etileno son 2.39 minutos y 2.42 minutos. Además la mezcla de los 2 gases se puede separar usando las condiciones mencionadas en el numeral 4.3.2

Figura 4-2. Cronogramas para los gases puros y la mezcla de estos



*Eje horizontal: Tiempo (minutos). Eje vertical: Área (μVs)

4.4.2 Curvas de calibración acetileno y etileno

Con el fin de determinar la curva de calibración de los gases en evaluación se empleó el cromatógrafo de gases alimentando al equipo con diferentes concentraciones del gas. El equipo reportó es el área del pico del gas detectado en μVs, y por ende la curva de calibración permite determinar esas unidades a qué concentraciones del gas en umol corresponden. Se realizaron las curvas de calibración de acetileno y etileno y se presentan en las Figura 4-3 y Figura 4-4.

Figura 4-3 Curva de calibración para acetileno usando las condiciones mencionadas en el numeral 4.3.2

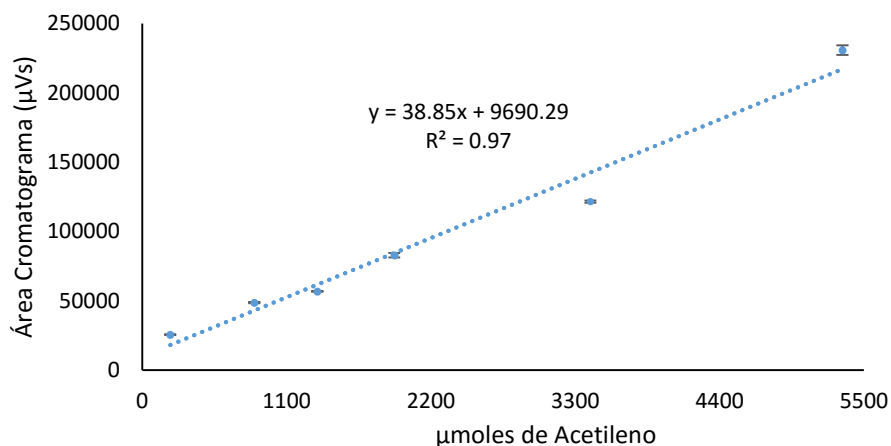
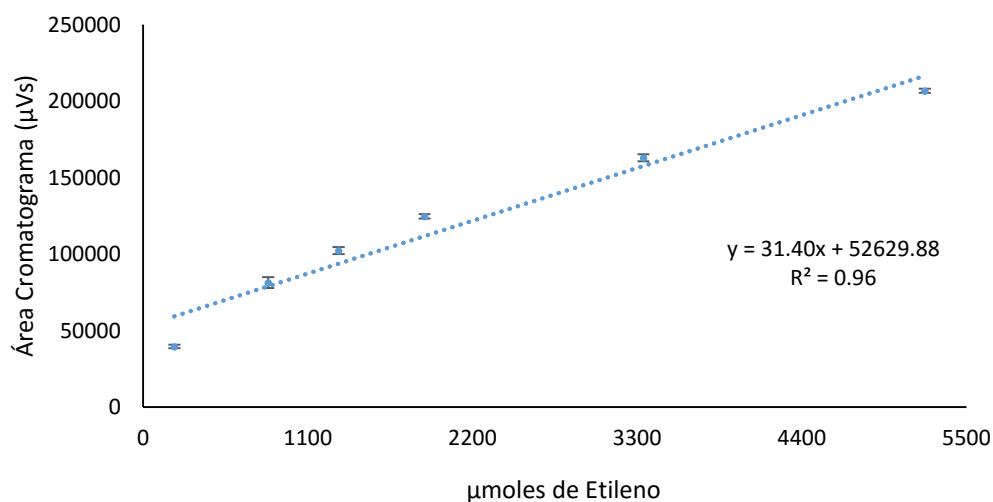


Figura 4-4. Curva de calibración para etileno usando las condiciones mencionadas en el numeral 4.3.2



4.4.3 Fijación de nitrógeno en medio NFb por método ARA

Se realizó el método ARA para evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas *B. subtilis* EA-CB0575, A320, y *Azospirillum brasilense* Cd. Las dos últimas son controles positivos por método NFb, adicionalmente *A. brasilense* Cd también ha sido probada por método ARA por Bashan et al., 1998. Se realizó además la evaluación al medio sólo para

descartar interferencia en los resultados debido al medio. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 4-2.

Tabla 4-2 Resultados del método ARA para la evaluación de la fijación de nitrógeno para las cepas A320, *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y *Azospirillum brasilense* Cd en medio NFb.

Tratamiento	Control medio NFb			Microorganismo A320		
Tiempo (h)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)
0	4077.50 Aa	0.00 Aa	2.38	3941.97 Aa	0.00 Aa	2.38
0.5	3809.81 Aa	0.00 Aa	2.34	0.00 Bb	3209.77 Bb	2.44
1	3950.56 Aa	0.00 Aa	2.38	0.00 Bb	3767.72 Bc	2.43

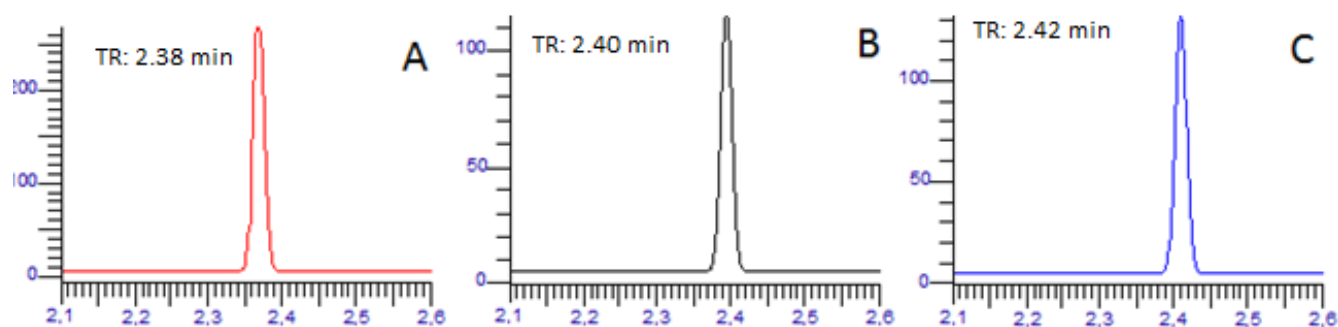
Tratamiento	<i>A. brasilense</i> Cd			<i>B. subtilis</i> EA-CB0575		
Tiempo (h)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)
0	4080.76 Aa	0.00 Aa	2.37	3982.26 Aa	0.00 Aa	2.39
0.5	0.00 Bb	3285.03 Bb	2.42	0.00 Bb	3381.95 Bb	2.41
1	0.00 Bb	3868.97 Bc	2.43	0.00 Bb	3868.97 Bc	2.43

*Letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tiempos de cada tratamiento para el mismo gas, mayúsculas indican diferencia significativa entre mismo ciclo del mismo gas. Las diferencias significativas se encontraron con ANOVA-unifactorial, con valor-P < 0.05, y de acuerdo al Test de LSD de rangos múltiples.

De acuerdo a los resultados presentados, se determinó que en Control medio NFb no registró presencia de etileno y para este tratamiento no se presentaron cambios estadísticamente significativos en la cantidad de μmoles de acetileno en el tiempo (valor-P= 0.47). Además, no se evidencian diferencias significativas en la concentración de acetileno entre tratamientos en el tiempo cero (Valor-P= 0.83).

En los tratamientos donde hay presencia de bacteria luego de 30 minutos no se evidenció presencia de acetileno en los diferentes tratamientos. Sin embargo, si se evidenció pico correspondiente al tiempo de retención del etileno tanto a la media hora como a una hora. La reducción del acetileno a etileno se puede evidenciar en los cromatogramas, donde se cambia el tiempo de la aparición del pico como se presenta en la figura 4-5.

Figura 4-5. Cromatogramas a diferentes tiempos del tratamiento para cultivo de *Azospirillum brasilense* Cd en medio NFb. A: Tiempo 0 h, B: Tiempo 0.5 h, C: Tiempo 1h. TR: Tiempo de retención.

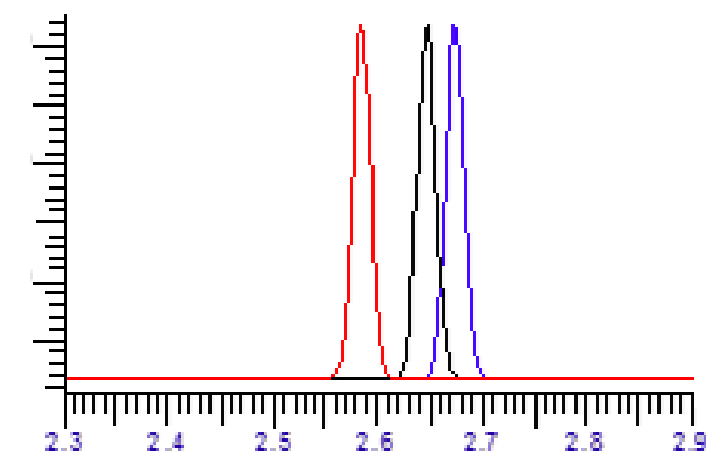


*Eje horizontal: Tiempo (minutos). Eje vertical: Área (µVs)

4.4.4 Evaluación de la Fijación de nitrógeno en cocultivos de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 con *Bacillus subtilis* EA-CB0575 por método ARA

Para determinar si uno de los posibles mecanismos de promoción de crecimiento de la microalga *C. sorokiniana* UTEX 1230 por parte de *B. subtilis* EA-CB0575 es la fijación de nitrógeno se evaluó la fijación de nitrógeno del cocultivo del microorganismo en medio BBM por medio de la metodología ARA. Se evaluaron los tratamientos mencionados en la Tabla 4.1. Los datos obtenidos para la concentración de acetileno y etileno se muestran en la Tabla 4.3

Figura 4-6. Cromatogramas a diferentes tiempos del tratamiento para cocultivo *C. sorokiniana* UTEX1230 + *B. subtilis* EA-CB0575 en medio BBM sin nitrógeno. Línea roja: Tiempo 0 h, Línea negra: Tiempo 0.5 h, Línea azul: Tiempo 1h.



*Eje horizontal: Tiempo (minutos). Eje vertical: Área (µVs)

Tabla 4-3 . Resultados del método ARA para la evaluación de la fijación de nitrógeno en el cocultivo *C. sorokiniana* UTEX1230-*B. subtilis* EA-CB0575 y sus respectivos controles.

Tratamiento	BBM libre de nitrógeno			<i>C. sorokiniana</i> UTEX1230		
Tiempo (h)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)
0	3595.99 Aa	0.00 Aa	2.39	3647.32 Aa	0.00 Aa	2.39
0.5	3175.24 Aa	0.00 Aa	2.39	3067.79 Aa	0.00 Aa	2.39
1	2974.87 Aa	0.00 Aa	2.37	3016.64 Aa	0.00 Aa	2.37

Tratamiento	<i>B. subtilis</i> EA-CB0575			<i>C. sorokiniana</i> UTEX1230 + <i>B. subtilis</i> EA-CB0575		
Tiempo (h)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)	Acetileno (μmol)	Etileno (μmol)	T.Retención (min)
0	3805.36 Aa	0.00 Aa	2.38	3804.23 Aa	0.00 Aa	2.38
0.5	0.00 Bb	1309.51 Bb	2.40	0,00 Bb	2254.08 Bb	2.41
1	0.00 Bb	1873.24 Bb	2.40	0,00 Bb	2330.80 Bb	2.41

*Letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tiempos de cada tratamiento para el mismo gas, mayúsculas indican diferencia significativa entre mismo ciclo del mismo gas. Las diferencias significativas se encontraron con ANOVA-unifactorial, con valor-P < 0.05, y de acuerdo al Test de LSD de rangos múltiples.

Se observó que en los tratamientos medio BBM sin nitrógeno y cultivo de *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 puro no presentaron presencia de etileno, y para estos tratamientos no se presentaron cambios estadísticamente significativos en la cantidad de μmoles de acetileno en el tiempo (Valor-P= 0.79). Además no se evidencian diferencias significativas en la concentración de acetileno entre tratamientos en el tiempo cero (Valor-P=0.99). Los tratamientos en los cuales hubo presencia del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 muestran una movilización del pico del acetileno en unos pocos segundos, hacia el rango de tiempo donde el pico del etileno ha sido detectado y no se observa aparición del pico que está cerca de 2.37-2.39 minutos, correspondiente al pico del acetileno. Luego del minuto 30, desaparece el acetileno de los tratamientos *B. subtilis* EA-CB0575 y el cocultivo *C. sorokiniana* UTEX1230 + *B. subtilis* EA-CB0575, pero se detecta el etileno y no varía su concentración luego de este punto.

4.5 Discusión

Este objetivo del proyecto buscaba determinar si la fijación de nitrógeno es uno de los mecanismos por los cuales la PPGB *B. subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de la microalga *C. sorokiniana* UTEX 1230, con el fin de aportar al estudio de comportamiento eucariota-procariota, empleando la microalga como modelo de planta unicelular y siendo un posible método de aumento en la concentración de la microalga para futuros usos de esta biomasa. La detección de la capacidad de fijación se realizó por medio del método ARA, determinando que los medios NFb y el BBM sin nitrógeno no fijan nitrógeno debido a que no se detectó etileno luego de ponerlos en una atmósfera con acetileno. De esta manera los medios sin presencia de microorganismos se consideran un correcto control absoluto para el experimento. Además que los medios no afectan la cantidad de acetileno en la atmósfera ya que no se presentaron diferencias significativas en la concentración de acetileno en el tiempo.

Se determinó que la microalga *C. sorokiniana* UTEX 1230, no fija nitrógeno por sí sola debido a que al ser sembrada en una atmósfera con acetileno no lo reduce a etileno, esto está de acuerdo con la teoría que solo bacterias y cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno (Berman-Frank et al., 2003).

Las bacterias A320, *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y *Azospirillum brasilense* Cd tienen la capacidad de reducir acetileno en etileno, esto se puede evidenciar por la presencia de etileno (3285.03 y 3868.97 μmol de C_2H_4) luego de 30 min de haber sembrado las bacterias en una atmósfera con acetileno. Además, en medio BBM sin nitrógeno *Bacillus subtilis* EA-CB0575 produjo 1309,51 μmol de C_2H_4 cuando crece en una atmósfera con acetileno.

La presencia de etileno nos indica se está reduciendo el acetileno en este y debido a que esta reacción es indicativo de la actividad nitrogenasa y por ende de la fijación biológica de nitrógeno, se puede sugerir que estas bacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico. Además, Franco y Santa María, 2015 (sin publicar) encontraron algunos genes *nif* en el genoma del *B. subtilis* EA-CB0575, este resultado y el de método de ARA en NFb puede sugerir que esta cepa es fijadora de nitrógeno.

Bashan et al. (1989) usando el método ARA determinó que *Azospirillum brasilense* Cd fija nitrógeno atmosférico, debido a que esta bacteria es capaz de producir a una tasa de 55 μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ proteína minuto, cuando se siembra en medio BL libre de nitrógeno en

una atmósfera con acetileno. Otros reportes como el trabajo de Xie et al. (1998) presentan aislamientos de 16 cepas fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz, al usar el método de reducción de acetileno. En este trabajo se pudieron encontrar algunas cepas del género *Bacillus* con capacidad de fijación. Habibi et al. (2014) aislaron varias cepas fijadoras de nitrógeno, las cuales fueron evaluadas por el método ARA encontrando que *B. altitudinis* produce 3.9 nmol de C_2H_4 / h $\cdot 10^6$ células y *B. pumilus* reduce 5.9 nmol de C_2H_4 / h $\cdot 10^6$ células.

En cocultivo *C. sorokiniana* UTEX1230 con *B. subtilis* EA-CB0575, la bacteria produce 2254.08 μ mol de C_2H_4 , esta cantidad es mayor que la cantidad producida por la bacteria sembrada individualmente, ya que solo produce 1873.24 μ mol de C_2H_4 . Hernández et al. (2009) evaluó la fijación de nitrógeno en el cocultivo inmovilizados de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 con *Bacillus pumilus* ES4 en medio SGM libre de nitrógeno, se encontró que en cocultivo se aumenta la cantidad de etileno producido comparado con la bacteria sola, ya que la productividad en cocultivo es 23 nmol de C_2H_4 /10⁴ UFC h, mientras en la bacteria sola tiene una productividad 20 nmol de C_2H_4 /10⁴ UFC h, lo que equivale en un aumento del 15%.

Debido a la capacidad de la bacteria *B. subtilis* EA-CB0575 de reducir acetileno en etileno en los diferentes tratamientos se sugiere que la bacteria puede tener la enzima nitrogenasa activa, sin embargo no se puede asegurar que la que fije nitrógeno ambiental. Pero para definir si es por este mecanismo que se promueve el crecimiento de la microalga *C. sorokiniana* UTEX 1230 es necesario usar metodologías de detección más avanzadas como marcación con isótopos radioactivos, NanoSIM, entre otros y así además determinar si la microalga está aprovechando el nitrógeno fijado por la bacteria.

4.6 Conclusiones

El microorganismo *C. sorokiniana* UTEX 1230 en medio NFb y BBM sin nitrógeno no posee la capacidad de reducir el acetileno en forma de etileno, indicativo de que no fijan nitrógeno ambiental. Las Bacterias A320, *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y *Azospirillum brasilense* Cd en medio NFB cultivadas en una atmósfera de acetileno produjeron etileno y *B. subtilis* EA-CB0575 produce etileno cuando crece en medio BBM libre de nitrógeno, lo que permite sugerir que estas bacterias son fijadoras de nitrógeno. En el cocultivo *C. sorokiniana* UTEX1230 con *B. subtilis* EA-CB0575 en medio BBM libre de nitrógeno, la bacteria reduce

acetileno en etileno y en mayor proporción que la bacteria en crecimiento individual, por lo cual también se sugiere que hay fijación biológica del gas.

Para estar seguros de este mecanismo de promoción por parte de la bacteria se recomienda verificar por otros métodos dicha fijación y a la vez determinar si la microalga aprovecha el nitrógeno fijado

Conclusiones y recomendaciones

En estudio se evaluaron 22 PGPB aisladas de plantas de banano, e encontró que 10 de estas cepas poseen capacidad de crecimiento en medio NFb (medio libre de nitrógeno) y que podrían ser fijadoras de nitrógeno atmosférico. Las cepas que crecieron en el medio NFb pertenecen a las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Mientras que 12 no crecieron en medio NFb por lo cual se descarta que sean fijadoras de nitrógeno.

Al cocultivar *C. sorokiniana* con *B. subtilis* EA-CB0575 se aumenta en un 94% la concentración celular de la microalga en comparación con el cultivo de microalga sola en medio BBM sin nitrógeno, por lo cual se puede sugerir que la bacteria promueve el crecimiento de la microalga. Además en cocultivo, la bacteria aumentó el área en un 450% y los parámetros cinéticos de la microalga en un 73% comparado con el cultivo de la microalga sola.

El microorganismo *C. sorokiniana* UTEX 1230 en medio BBM sin nitrógeno no posee la capacidad de reducir el acetileno en forma de etileno, indicativo que no fijan nitrógeno ambiental.

Las bacterias A320, *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y *Azospirillum brasilense* Cd en medio NFB creciendo en un atmosfera de acetileno producen etileno y *B. subtilis* EA-CB0575 produce etileno cuando crece en medio BBM libre de nitrógeno en una atmosfera con acetileno, lo que permite sugerir que estas bacterias son fijadoras de nitrógeno. A partir de los resultados de la siembra en NFb, el método ARA y la presencia del gen *nif* indican que *Bacillus subtilis* EA-CB0575 puede fijar nitrógeno.

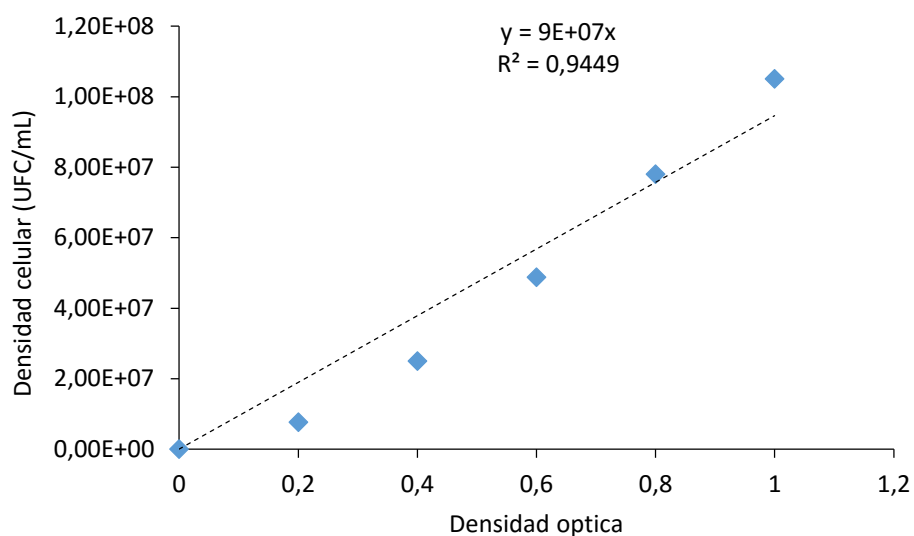
En el cocultivo *C. sorokiniana* UTEX1230 con *B. subtilis* EA-CB0575 en medio BBM libre de nitrógeno, la bacteria reduce acetileno en etileno y en mayor proporción que la bacteria en crecimiento individual, por lo cual también se sugiere que hay fijación biológica del gas.

Para poder asegurar que la fijación de nitrógeno es uno de los mecanismos de promoción del crecimiento microalga por parte de la bacteria es necesario usar metodologías de detección más avanzadas como marcación con isótopos radioactivos, NanoSIM, entre otros para determinar si la microalga está aprovechando el nitrógeno fijado por la bacteria.

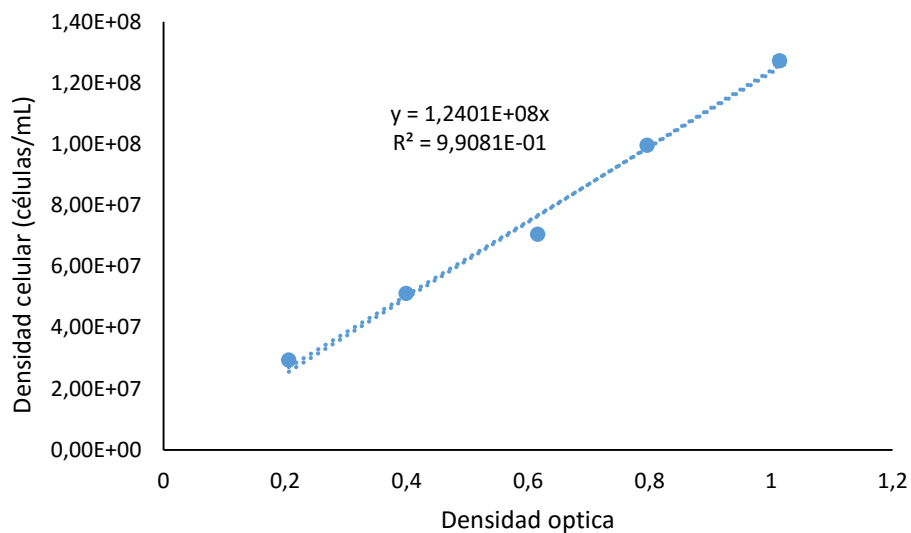
Además se recomienda evaluar otros mecanismos de promoción para elucidar mejor la interacción microalga-bacteria, para aportar al estudio del modelo simplificado de la interacción planta-bacteria.

Anexos

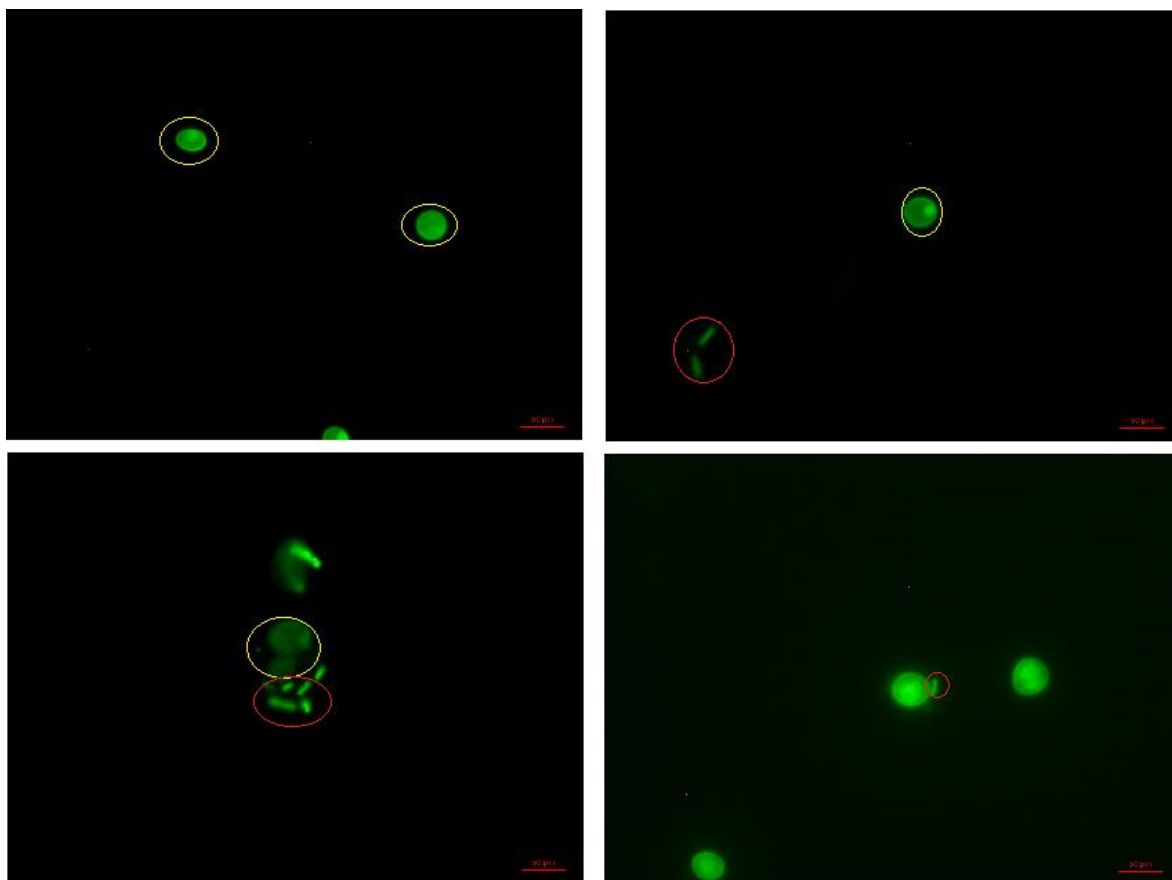
Anexo 1. Curva calibración para densidad celular (UFC/mL) vs densidad óptica (absorbancia) para *Bacillus subtilis* EA-CB0575 realizada por el método de unidades formadoras de colonia.



Anexo 2. Curva calibración para densidad celular (UFC/mL) vs densidad óptica (absorbancia) para *Bacillus subtilis* EA-CB0575 realizada por el método tinción con CSFE.



Anexo 3. Microscopías de fluorescencia de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 (100x) en BBM modificado sin nitrógeno.



*Encerrado en amarillo: *Chlorella sorokiniana* UTEX1230; Encerrado en rojo: *Bacillus subtilis* EA-CB0575

Bibliografía

- Abate, C., Callieri, D., Rodríguez, E., and Garro, O. (1996) Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. *Applied microbiology and biotechnology* **45**: 580-583.
- Adesemoye, A.O., and Kloepper, J.W. (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1-12.
- Adesemoye, A., Torbert, H., and Kloepper, J. (2010) Increased plant uptake of nitrogen from ¹⁵N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* **46**: 54 -58
- Aguilar, C., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2007) Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current opinion in microbiology* **10**: 638-643.
- Anderson, J.C. (2013) Refactoring Nitrogenase. In.
- Andrade, G., Esteban, E., Velasco, L., Lorite, M., and Bedmar, E. (1997) Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant and Soil* **197**: 19-23.
- Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M., Bajpai, R., and Stahl, U. (2010) Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of applied microbiology* **109**: 371-387.
- Bai, Y., Zhou, X., and Smith, D.L. (2003) Enhanced Soybean Plant Growth Resulting from Coinoculation of Strains with. *Crop science* **43**: 1774-1781.
- Baldani, J., Baldani, V., Seldin, L., and Döbereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**: 86-93.
- Bashan, Y., Singh, M., and Levanony, H. (1989) Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Canadian Journal of Botany* **67**: 2429-2434.

- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A., and Bacilio, M. (2002) Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils* **35**: 359-368.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., and Falkowski, P. (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* **154**: 157-164.
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K., and Tuteja, N. (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* **13**.
- Bloem, J. (1995) *Fluorescent staining of microbes for total direct counts*.
- Borde, X., Guieysse, B., Delgado, O., Munoz, R., Hatti-Kaul, R., Nugier-Chauvin, C. et al. (2003) Synergistic relationships in algal-bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. *Bioresource Technology* **86**: 293-300.
- Bureau, P.R. (2014) 2013 Population data sheet. In. Washington, DC: PRB.
- Butler, A. (1998) Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. *Science* **281**: 207-209.
- Camacho, R.D., Campos, V.L., Escalera, C.P., González, M.A., and Vázquez, G.I. (2004a). cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*. [WWW document]. URL <http://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria17/21.pdf>.
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J., Argel, L., Uribe-Velez, D. et al. (2012) Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology* **64**: 641-653.
- Chen, W., Mulchandani, A., and Deshusses, M.A. (2005) Environmental biotechnology: Challenges and opportunities for chemical engineers. *Aiche Journal* **51**: 690-695.
- Cherkasov, N., Ibhaddon, A.O., and Fitzpatrick, P. (2015) A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **90**: 24-33.
- Cho, D.-H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B.-H., Oh, H.-M., and Kim, H.-S. (2015) Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology* **175**: 578-585.
- Choix, F.J., de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2012a) Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **51**: 300-309.

- Choix, F.J., de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2012b) Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **51**: 294-299.
- Cole, J.J. (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*: 291-314.
- Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J., and Smith, A.G. (2005) Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438**: 90-93.
- Dalton, H., and Whittenbury, R. (1976) The acetylene reduction technique as an assay for nitrogenase activity in the methane oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* strain Bath. *Archives of Microbiology* **109**: 147-151.
- Danger, M., Oumarou, C., Benest, D., and Lacroix, G. (2007) Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. *Functional Ecology* **21**: 202-210.
- Dardanelli, M., Carletti, S.M., Paulucci, N.S., Medeot, D.B., Cáceres, E.A.R., Vita, F.A. et al. (2011) Benefits of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Rhizobia in Agriculture. In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Maheshwari, D.K. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-20.
- de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2008) Joint Immobilization of Plant Growth-Promoting Bacteria and Green Microalgae in Alginate Beads as an Experimental Model for Studying Plant-Bacterium Interactions. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 6797-6802.
- De-Bashan, L.E., Antoun, H., and Bashan, Y. (2005) Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology* **54**: 197-203.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., and Bashan, Y. (2015) Interaction of *Azospirillum* spp. with Microalgae: A Basic Eukaryotic-Prokaryotic Model and Its Biotechnological Applications. In *Handbook for Azospirillum*: Springer, pp. 367-388.
- De-Bashan, L.E., Moreno, M., Hernandez, J.-P., and Bashan, Y. (2002) Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research* **36**: 2941-2948.
- de-Bashan, L.E., Magallon, P., Antoun, H., and Bashan, Y. (2008) Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation

- of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology* **44**: 1188-1196.
- de-Bashan, L.E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V.K., and Bustillos, J.J. (2002) Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology* **48**: 514-521.
- de-Bashan, L.E., Schmid, M., Rothballer, M., Hartmann, A., and Bashan, Y. (2011) Cell-cell interaction in the eukaryote-prokaryote model of the microalgae *Chlorella vulgaris* and the bacterium *azospirillum brasilense* immobilized in polymer beads. *Journal of Phycology* **47**: 1350-1359.
- Derner, R.B., Ohse, S., Villela, M., De Carvalho, S.M., and Fett, R. (2006) Microalgae, products and applications. *Microalgas, produtos e aplicações* **36**: 1959-1967.
- Devereux, R., Loeblich III, A.R., and Fox, G.E. (1990) Higher plant origins and the phylogeny of green algae. *Journal of molecular evolution* **31**: 18-24.
- De-Bashan, L.E., Antoun, H., and Bashan, Y. (2008) Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*1. *Journal of Phycology* **44**: 938-947.
- Dilworth, M. (1966) Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **127**: 285-294.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., and Chen, S. (2005) Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology* **99**: 1271-1281.
- Dréo, J. (2009) Nitrogen cycle. In.
- Earl, A.M., Losick, R., and Kolter, R. (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology* **16**: 269-275.
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., and Hartmann, A. (2001) *Azospirillum doebereineriae* sp nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C-4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 17-26.
- Elkoca, E., Kantar, F., and Sahin, F. (2007) Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition* **31**: 157-171.

- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M., and Gunes, A. (2010) Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae* **124**: 62-66.
- Ezeonu, C.S., Tagbo, R., Anike, E.N., Oje, O.A., and Onwurah, I.N.E. (2012) Biotechnological tools for environmental sustainability: prospects and challenges for environments in Nigeria-a standard review. *Biotechnology research international* **2012**: 450802.
- FAO. (2014) Pesticide Use in Colombia World between 1992 - 2012. In.
- Fayez, M., and Daw, Z.Y. (1987) Effect of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on cotton *Gossypium barbadense*. *Biology and Fertility of Soils* **4**: 91-96.
- Fishbeck, K., Evans, H.J., and Boersma, L.L. (1973) Measurement of nitrogenase activity of intact legume symbionts in situ using the acetylene reduction assay. *Agronomy Journal* **65**: 429-433.
- Flett, R., Hamilton, R., and Campbell, N. (1976) Aquatic acetylene-reduction techniques: solutions to several problems. *Canadian Journal of Microbiology* **22**: 43-51.
- Forján, E., Navarro, F., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ruíz-Domínguez, M.C., Gojkovic, Ž. et al. (2015) Microalgae: Fast-Growth Sustainable Green Factories. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **45**: 1705-1755.
- Galloway, J.N. (1998) The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environmental pollution* **102**: 15-24.
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P. et al. (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* **70**: 153-226.
- Garg, N. (2007) Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. *Agronomy for sustainable development* **27**: 59-68.
- Gaviria, C., and Zazini, T. (2014) Evaluación de la promoción de crecimiento de *Bacillus subtilis* ea-cb0575 en cultivos de banano, crisantemo y café.
- Glick, B.R., and Pasternak, J.J. (1998) Principles and applications of recombinant DNA. *ASM, Washington DC*: 683.
- Gonzalez-Bashan, L.E., Lebsky, V.K., Hernandez, J.P., Bustillos, J.J., and Bashan, Y. (2000) Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Canadian journal of microbiology* **46**: 653-659.

- Goswami, D., Vaghela, H., Parmar, S., Dhandhukia, P., and Thakker, J.N. (2013) Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas* spp. strain OG isolated from marine water. *Journal of Plant Interactions* **8**: 281-290.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., and Malcata, F.X. (2011) Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *Biotechnology Progress* **27**: 597-613.
- Guo, Z., and Tong, Y.W. (2014) The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology* **26**: 1483-1492.
- Habibi, S., Djedidi, S., Prongjunthuek, K., Mortuza, M., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto, H., and Yokoyama, T. (2014) Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant and Soil* **379**: 51-66.
- Hardy, R., Burns, R., and Holsten, R.D. (1973) Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* **5**: 47-81.
- Hardy, R.W., Holsten, R., Jackson, E., and Burns, R. (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiology* **43**: 1185-1207.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., and Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* **60**: 579-598.
- Hernandez, J.-P., de-Bashan, L.E., Rodriguez, D.J., Rodriguez, Y., and Bashan, Y. (2009) Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology* **45**: 88-93.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., and Boddey, R.M. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* **311**: 1-18.
- Holguin, G., and Bashan, Y. (1996) Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 1651-1660.
- Holguin, G., Guzman, M.A., and Bashan, Y. (1992) Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees their isolation identification and in-vitro interaction with rhizosphere *staphylococcus*-sp. *FEMS Microbiology Ecology* **101**: 207-216.
- Horrigan, L., Lawrence, R.S., and Walker, P. (2002) How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives* **110**: 445-456.

- Hynes, R.K., Leung, G.C., Hirkala, D., and Nelson, L.M. (2008) Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. *Canadian Journal of Microbiology* **54**: 248-258.
- IFA, I.F.I.A.-. (2014) Fertilizer Outlook 2014-2018 In *Fertilizer Outlook 2014-2018*. Heffer, P., and Prud'homme, M. (eds). Sydney.
- Jha, B., Thakur, M.C., Gontia, I., Albrecht, V., Stoffels, M., Schmid, M., and Hartmann, A. (2009) Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology* **45**: 62-72.
- Ji, X., Zhang, Z., and Cai, L. (2011) Culture of *Chlorella* spp and Optimization of Growth Condition. In *Frontiers of Green Building, Materials and Civil Engineering, Pts 1-8*. Sun, D., Sung, W.P., and Chen, R. (eds), pp. 2887-2890.
- Jones, C.S., and Mayfieldt, S.P. (2012) Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 346-351.
- Kanno, T. (2005) *Chlorella Vulgaris and Chlorella Vulgaris Extract (CVE): The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier*. Woodland Pub.
- Kegley, S., Neumeister, L., and Martin, T. (1999) *Disrupting the Balance: Ecological Impacts of Pesticides in California*. California: California Pesticide Reform.
- Kondo, T., and Kondo, M. (1996) Efficient production of acetic acid from glucose in a mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Acetobacter* sp. *Journal of fermentation and bioengineering* **81**: 42-46.
- Lakaniemi, A.-M., Tuovinen, O.H., and Puhakka, J.A. (2013) Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers - A review. *Bioresource Technology* **135**: 222-231.
- Lee, B.-K., Katano, T., Kitamura, S.-I., Oh, M.-J., and Han, M.-S. (2008) Monitoring of algicidal bacterium, *Alteromonas* sp strain A14 in its application to natural *Cochlodinium polykrikoides* blooming seawater using fluorescence in situ hybridization. *Journal of Microbiology* **46**: 274-282.
- Li, Y.X., Zhao, F.J., and Yu, D.D. (2015) Effect of Nitrogen Limitation on Cell Growth, Lipid Accumulation and Gene Expression in *Chlorella sorokiniana*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **58**: 462-467.
- Liang, S., Liu, X., Chen, F., and Chen, Z. (2004) Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiologia* **512**: 45-48.
- Litchfield, C.D., Colwell, R.R., and Prescott, J. (1969) Numerical taxonomy of heterotrophic bacteria growing in association with continuous-culture *Chlorella sorokiniana*. *Applied microbiology* **18**: 1044-1049.

- Lucy, M., Reed, E., and Glick, B.R. (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 1-25.
- Luna, M.F., Aprea, J., Crespo, J.M., and Boiardi, J.L. (2012) Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied Soil Ecology* **61**: 225-229.
- Maal, K.B., Emtiazi, G., and Nahvi, I. (2009) Production of alkaline protease by *Bacillus cereus* and *Bacillus polymixa* in new industrial culture mediums and its immobilization. *African Journal of Microbiology Research* **3**: 491-497.
- Mascarua-Esparza, M., Villa-Gonzalez, R., and Caballero-Mellado, J. (1988) Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil* **106**: 91-95.
- Mena-Violante, H.G., and Olalde-Portugal, V. (2007) Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* **113**: 103-106.
- Merrill, L., Dunbar, J., Richardson, J., and Kuske, C.R. (2006) Composition of *Bacillus* species in aerosols from 11 US cities. *Journal of forensic sciences* **51**: 559-565.
- Miller, R., and Eady, R. (1988) Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *Biochem J* **256**: 429-432.
- Morita, M., Watanabe, Y., and Saiki, H. (2001) Evaluation of photobioreactor heat balance for predicting changes in culture medium temperature due to light irradiation. *Biotechnology and Bioengineering* **74**: 466-475.
- Munoz, R., and Guieysse, B. (2006) Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water research* **40**: 2799-2815.
- Nakashima, T., Miyazaki, Y., Matsuyama, Y., Muraoka, W., Yamaguchi, K., and Oda, T. (2006) Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium gamma-proteobacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**: 684-690.
- Ngamau, C.N., Matiru, V.N., Tani, A., and Muthuri, C.W. (2015) Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., and Sahin, F. (2006) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae* **111**: 38-43.
- Oswald, W.J., and Benemann, J. (1976) Fertilizer from algal biomass. In *Proceedings of the second symposium on Research Applied to National Needs (RANN II) Symposium*.

- Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F., and Alarcón, R. (2014) Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicology Letters* **230**: 157-165.
- Pasquet, V., Chérouvrier, J.-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.-M., Bérard, J.-B. et al. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry* **46**: 59-67.
- Perez-Garcia, O., De-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., and Bashan, Y. (2010) Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology* **46**: 800-812.
- Pimentel, D. (2005) Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment Development and Sustainability* **7**: 229-252.
- Pires, J.C.M., Martins, F.G., Alvim-Ferraz, M.C.M., and Simões, M. (2011) Recent developments on carbon capture and storage: An overview. *Chemical Engineering Research and Design* **89**: 1446-1460.
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., and Simões, M. (2012) Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**: 3043-3053.
- Population_Reference_Bureau (2014) 2013 Population data sheet. In. Washington, DC: PRB.
- Posada-Urbe, L.F., Romero-Tabarez, M., and Villegas-Escobar, V. (2015) Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and biosystems engineering* **38**: 1879-1888.
- Prajapati, S.K., Malik, A., and Vijay, V.K. (2014) Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. *Applied Energy* **114**: 790-797.
- PRB (2014) 2013 Population data sheet. In. Washington, DC: PRB.
- Qu, L., Wang, R., Zhao, P., Chen, R., Zhou, W., Tang, L., and Tang, X. (2014) Interaction between *Chlorella vulgaris* and bacteria: interference and resource competition. *Acta Oceanologica Sinica* **33**: 135-140.
- Rahaman, M.S.A., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., and Chen, H.-L. (2011) A review of carbon dioxide capture and utilization by membrane integrated microalgal cultivation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**: 4002-4012.

- Raupach, G.S., and Kloepper, J.W. (1998) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* **88**: 1158-1164.
- Rekha, P., Lai, W.-A., Arun, A., and Young, C.-C. (2007) Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource technology* **98**: 447-451.
- Ruiz-Marin, A., Canedo-Lopez, Y., Campos-Garcia, S.d.C., Sabido-Perez, M.Y., and Zavala-Loria, J.d.C. (2013) Biodegradación de contaminantes de aguas residuales por lodos activados coinmovilizado con *Scenedesmus obliquus*. *Agrociencia* **47**: 429-441.
- Safonova, E.T., Dmitrieva, I., and Kvitko, K. (1999) The interaction of algae with alcanotrophic bacteria in black oil decomposition. *Resources, conservation and recycling* **27**: 193-201.
- Saharan, B., and Nehra, V. (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res* **21**: 1-30.
- Santos, V.B., Araujo, A.S.F., Leite, L.F.C., Nunes, L.A.P.L., and Melo, W.J. (2012) Soil microbial biomass and organic matter fractions during transition from conventional to organic farming systems. *Geoderma* **170**: 227-231.
- Schöllhorn, R., and Burris, R. (1967) Acetylene as a competitive inhibitor of N-2 fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**: 213.
- Seefeldt, L.C., Yang, Z.-Y., Duval, S., and Dean, D.R. (2013) Nitrogenase reduction of carbon-containing compounds. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1827**: 1102-1111.
- Seldin, L., Van Elsas, J., and Penido, E. (1984) *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 451-456.
- Slattery, M., Rajbhandari, I., and Wesson, K. (2001) Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microbial Ecology* **41**: 90-96.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 87-96.
- Staal, M., Lintel-Hekkert, S.t., Harren, F., and Stal, L. (2001) Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environmental Microbiology* **3**: 343-351.

- Stewart, W., Fitzgerald, G., and Burris, n. (1967) In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**: 2071.
- Suárez-Mesa, A.M. (2014) Aislamiento y evaluación de rizobacterias para promover el crecimiento temprano de *Brachiaria decumbens* en un suelo degradado por minería. In. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., and Naidu, R. (2011) Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances* **29**: 896-907.
- Talebi, M., Emtiazi, G., Sepahy, A.A., and Zaghian, S. (2013) Zymogram Analysis of Alkaline Keratinase Produced by Nitrogen Fixing *Bacillus pumilus* ZED17 Exhibiting Multiprotease Enzyme Activities. *Jundishapur Journal of Microbiology* **6**.
- Tamer, E., Amin, M., Ossama, E., Bo, M., and Benoit, G. (2006) Biological treatment of industrial wastes in a photobioreactor. *Water Science & Technology* **53**: 117-125.
- Tate, J.J., Gutierrez-Wing, M.T., Rusch, K.A., and Benton, M.G. (2013) The Effects of Plant Growth Substances and Mixed Cultures on Growth and Metabolite Production of Green Algae *Chlorella* sp.: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**: 417-428.
- UTEX (2007). Bristol Medium. URL <http://www.sbs.utexas.edu/utex/insideUtex.aspx>
- Valderrama, L.T., Del Campo, C.M., Rodriguez, C.M., de- Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2002) Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research* **36**: 4185-4192.
- Vessey, J.K. (1994) Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil* **158**: 151-162.
- Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K., and Collet, C. (2005) Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Reports* **24**: 629-641.
- Watanabe, K., Takihana, N., Aoyagi, H., Hanada, S., Watanabe, Y., Ohmura, N. et al. (2005) Symbiotic association in *Chlorella* culture. *FEMS microbiology ecology* **51**: 187-196.
- Witty, J., and Minchin, F. (1988) Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. In *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*: Springer, pp. 331-344.
- Wu, H.L., Hseu, R.S., and Lin, L.P. (2001) Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **42**: 115-121.

- Xie, G., Su, B., and Cui, Z. (1998) Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River Valley. *Weishengwu Xuebao* **38**: 480-483.
- Yokoyama, T. New nitrogen-fixing bacteria of *Bacillus*, preferably *Bacillus pumilus*, useful in agent for promoting growth of plant. In: Univ Tokyo Agric & Technology Nat Univ (Uytn-C).
- Yokoyama, T. (2012) New nitrogen-fixing bacteria of *Bacillus*, preferably *Bacillus pumilus*, useful in agent for promoting growth of plant. In: Univ Tokyo Agric & Technology Nat Univ (Uytn-C).
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B.R., and Musarrat, J. (2006) Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* **64**: 991-997.
- Zheng, Y.B., Li, T.T., Yu, X.C., Bates, P.D., Dong, T., and Chen, S.L. (2013) High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Applied Energy* **108**: 281-287.
- Zhou, N., Zhao, S., and Shen, X. (2014) Nitrogen cycle in the hyporheic zone of natural wetlands. *Chinese Science Bulletin* **59**: 2945-2956.
- Zhu, J., Rong, J., and Zong, B. (2013) Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis* **34**: 80-100.
- Zuberer, D.A., and Silver, W. (1978) Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. *Applied and environmental Microbiology* **35**: 567-575.